

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Bioquímica

**EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE TEJIDO
CONECTIVO:
MODULADOR REDOX Y
CITOQUINA PROINFLAMATORIA
IMPLICADA EN LA GÉNESIS DEL DAÑO
VASCULAR**

TESIS DOCTORAL
Raúl Rodrigues Díez
Madrid, 2015

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE TEJIDO CONECTIVO:
MODULADOR REDOX Y
CITOQUINA PROINFLAMATORIA
IMPLICADA EN LA GÉNESIS DEL DAÑO VASCULAR**

**Memoria que presenta el licenciado en Biología
Raúl Rodrigues Díez
para optar al grado de Doctor
por la Universidad Autónoma de Madrid**

**Directores: Marta Ruiz-Ortega y Jesús Egido de los Ríos
Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz
Universidad Autónoma de Madrid**



Don Jesús Egido de los Ríos, Catedrático de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y Doña Marta Ruiz-Ortega, Profesor contratado Doctor de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICAN

Que Don Raúl Rodríguez Díez, Licenciado en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “El factor de crecimiento de tejido conectivo: modulador redox y citoquina proinflamatoria implicada en la génesis del daño vascular” que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 1 de Junio de 2014.

Los directores de tesis,

Dr. Jesús Egido de los Ríos

Dra. Marta Ruiz-Ortega

"El hombre que se levanta es aún más grande que el que no ha caído".

Concepción Arenal

"Si se cree y se trabaja, se puede".

Diego Pablo Simeone

AGRADECIMIENTOS

Esta es, probablemente, la parte que más me va a costar escribir de toda la tesis ya que en este apartado es muy fácil cometer algún “fallo” y olvidar dar las gracias a gente que me ha ayudado durante todo este tiempo, por lo que antes de nada quiero empezar pidiendo perdón si alguien se me olvida.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis, Marta y Jesús, por darme la oportunidad de incorporarme a este laboratorio y ofrecerme todos los medios disponibles y sus conocimientos para poder realizar esta tesis, y a Rafa Selgas, el cual ha conseguido que pueda seguir dos años más trabajando en esta tesis. También quiero agradecer su apoyo a todos los “jefes” del laboratorio: Luis, Carmen, Jose Luis, Juan, Oscar, Sebas y Adrián, ya que siempre que lo he necesitado han estado ahí. No puedo pasar tampoco sin agradecer al resto de personas del laboratorio su ayuda y sus consejos: Ana Sanz, Liliana, Loli, Lara, Jonay, Olga, Tarín, Elena, Iolanda, Ainhoa, Carlota, Cris, Valva, Alfonso, Juanma, Olha, Kike, Esther, Belén, Elisa, Cristian, Rosario, Patri y Susana. Gracias también a Pilar, Isabel y Carmen por su trabajo y las conversaciones a la hora de calentar.

Ahora es el turno de mi “grupo” de investigación. Jose y Sandra, muchas gracias por los buenos ratos en los desayunos, comidas etc... y por ayudarme cuando lo he necesitado, ya os queda poco también a vosotros (sobre todo a ti Sandra) a sí que mucho ánimo que todo llega. Mati, muchas gracias por tus conocimientos, espero que te vaya muy bien en Alcalá y que pronto colaboremos en algún trabajo!!. Caro, cuando lea la tesis estarás “en tu País”, así que espero que te conviertas en “jefa” del laboratorio y nos busques un huequito...Ah!!, y ve moviendo todos los negocios que tenemos preparados para Chile que verás cómo nos forramos!!. Maca, te dejo el legado “vascular”, a si que espero que te sea muy productivo y que te vaya todo muy bien, estoy seguro de que vas a hacer una Tesis muy buena y ya sabes que si necesitas que te ayude a algo no tienes más que pedirlo...aunque sabes que te contestaré “no”..jeje. Ana, mejor dicho “Ana G.”, muchas gracias por estos últimos años, por haberme ayudado a dar el último impulso a todo lo que estaba haciendo y por enseñarme muchas técnicas y conocimientos...estoy seguro de que todo te va a ir muy bien y de que seguiremos colaborando en muchos trabajos!!. También quiero dar las gracias a muchas personas que en algún momento me ayudaron en el laboratorio, como Jon, Elsa, Alberto, Avo, Oscar “coletas”, Sergio, Priscila, Julio, Beñat...y muchos más que seguro que me dejo en el tintero...

Muchas gracias a “mis Kintos”; a Javi, Pardo, Maxi, Eva, Victor, Chema, Ana, Rocio; a mis compañeros de la universidad (Alex, Santi, Jose, “Las Lauras”, Ángela, Vicente...). Gracias a todos porque de alguna manera y en algún momento habéis contribuido a que llegue este momento.

Este apartado es para una persona que podría meter en todos los demás apartados ya que es “jefa”, compañera de “labo”, de grupo y....mi hermana. Rakel, muchas gracias por estar ahí siempre que lo he necesitado y enseñarme prácticamente todo lo que se tanto en la ciencia como fuera de ella. Espero que llegues a lo más alto en la investigación porque no he conocido a nadie en la vida que se lo merezca más que tu, tanto por conocimientos como por esfuerzo. Sabes que me tienes para lo que necesites.

Otras dos personas que han conseguido que yo esté en este punto han sido mis padres. Manolo y Mari Paz. Muchas gracias por haberos sacrificado toda la vida por nosotros, por darnos incluso más de lo que podíais, por apoyarnos en todo lo que hemos querido hacer y por enseñarnos que, aunque nadie te regala nada en la vida, con esfuerzo todo se puede conseguir. Espero que sigáis siendo como sois y que os vaya todo muy bien en la vida porque os lo merecéis...os quiero mucho. También quiero dar las gracias al resto de mis familia, a mis tíos, primos, sobrinos...y a mis abuelas: May (seguro que lo estarás viendo) y Paz, gracias por todo.

Finalmente quiero dar la gracias a la persona más importante de mi vida, Rosa. Muchas gracias por estar conmigo “en las buenas y en las malas”, por compartir tu vida conmigo y por ser como eres. Eres la persona más trabajadora que conozco y gracias a ti he conseguido esforzarme cada día más en cada cosa que hago. Espero que sigamos compartiendo todo en la vida y perdón por tener que aguantarme estos últimos meses de “estrés pretesis”...TE QUIERO!!!.

RESUMEN

El factor de crecimiento de tejido conectivo (CCN2/CTGF), es un gen de desarrollo que se encuentra reexpresado en determinadas condiciones patológicas. El gen de CCN2 codifica para una proteína matricelular compuesta por cuatro módulos, la cual puede ser degradada en diferentes fragmentos que presentan actividad biológica por sí mismos. Entre estos fragmentos, se ha descrito que el módulo IV C-terminal, denominado en este trabajo CCN2(IV), es capaz de regular varias funciones celulares. Tradicionalmente, CCN2 se ha considerado como un mediador de las respuestas fibróticas inducidas por otros factores como TGF- β , Ang II, o ET-1, aunque estudios más recientes sugieren que CCN2 podría tener también un rol importante en la activación de la respuesta inflamatoria. A nivel cardiovascular, se ha descrito un aumento en la expresión tisular de CCN2 en diversas patologías, incluida la aterosclerosis o la fibrosis cardiaca, aunque sus efectos directos sobre la pared vascular no han sido investigados. En el desarrollo de las enfermedades cardiovasculares, se ha descrito la implicación de numerosos procesos moleculares y rutas de señalización, como son la respuesta inflamatoria, el aumento en la producción de ROS o la fibrosis.

Como primer objetivo, se quiso determinar si en situaciones de daño vascular existía una asociación entre los niveles de CCN2 y la producción de ROS, utilizando para ello un modelo de infusión de Ang II en ratones. Una vez comprobado que en las aortas de los ratones tratados con Ang II existía un aumento en la producción de $O_2^{\cdot -}$ y que este se localizaba principalmente en las mismas zonas donde se observó un aumento de CCN2, se evaluó la hipótesis de que CCN2 podría estar regulando de forma directa procesos redox a nivel vascular. Por todo esto, el principal objetivo del presente trabajo fue investigar si CCN2(IV) podía inducir, de forma directa, un aumento en la producción de ROS, para lo cual se realizaron estudios en CMLVs y CEs en cultivo, y en aorta de ratón *ex vivo* e *in vivo*. Como segundo objetivo, se investigó si CCN2(IV) regulaba la función vascular e inducía procesos inflamatorios y fibróticos. Los resultados obtenidos indicaron que CCN2(IV), tanto en células en cultivo como en aorta de ratón *in vivo*, producía un aumento en la producción de $O_2^{\cdot -}$ y en la actividad NAD(P)H oxidasa. Además, el tratamiento con CCN2(IV) aumentó la respuesta contráctil vascular, generó disfunción endotelial, e indujo la activación de respuestas proinflamatorias, como son la activación de la ruta NF- κ B y la producción de mediadores proinflamatorios. Sin embargo, a los tiempos estudiados, CCN2(IV) no generó un aumento en los niveles de diversos factores profibróticos. Mediante abordajes farmacológicos y silenciamiento génico, demostramos que CCN2(IV), vía Nox1, causó un aumento en la producción de $O_2^{\cdot -}$ en aorta de ratón, el cual dio lugar a disfunción endotelial, a un aumento en la nitrosilación proteica y a una activación de la respuesta proinflamatoria. Finalmente, se demostró que EGFR era el receptor a través del cual CCN2(IV) ejercía sus acciones vasculares. En conjunto, estos resultados muestran que CCN2 puede actuar como una citoquina proinflamatoria y regular procesos redox mediante la activación del EGFR a nivel vascular, ampliando la visión tradicional de CCN2 y remarcando su importancia en las patologías cardiovasculares.

ABSTRACT

Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) is a developmental gene upregulated in pathological conditions including cardiovascular diseases. CCN2 is a gene that encodes a matricellular protein that can be degraded to biologically active fragments. Among them, the C-terminal module IV (named here CCN2(IV)) regulates many cellular functions. Traditionally, CCN2 has been considered as profibrotic mediator of several factors, including TGF- β , Ang II, or ET-1. Recently, emerging data suggest that CCN2 could participate in the regulation of the inflammatory response. CCN2 overexpression has been found in many cardiovascular diseases, including atherosclerosis and cardiac fibrosis. Among the molecular mechanisms and intracellular signalling systems involved in the pathogenesis of cardiovascular diseases, inflammation, reactive oxygen species (ROS) production and fibrosis have special relevance.

The first aim was to determine whether in cardiovascular pathological conditions there was an association between CCN2 levels and ROS production, using a model of systemic infusion of Ang II into mice. In Ang II-treated mice aorta increased ROS production was found mainly located in areas of CCN2 overexpression. Therefore, we evaluated the hypothesis that CCN2 could directly regulate redox processes at the vascular level. The main aim of this thesis was to investigate whether CCN2(IV) could directly increase ROS production, by performing experiments in cultured murine vascular smooth muscle cells (VSMCs), endothelial cells (EC), and in mice aorta *ex vivo* and *in vivo*. The second aim was to investigate whether CCN2(IV) could regulate vascular functions, as well as inflammatory and fibrotic processes. In cultured vascular cells and in mice aorta CCN2(IV) increased $O_2^{\cdot-}$ production and NAD(P)H oxidase activity. CCN2(IV) also induced an inflammatory response, characterized by endothelial dysfunction, increased protein nitrosylation, activation of the NF- κ B transcription factor and upregulation of proinflammatory markers (cytokines, adhesion molecules and chemokines). However, CCN2(IV) did not modulate profibrotic factors, at least at the time point evaluated. By pharmacological and gene silencing approaches we found that CCN2(IV), via Nox1, increased $O_2^{\cdot-}$ production in murine aorta, linked to endothelial dysfunction, increased protein nitrosylation and the upregulation of proinflammatory factors. Finally, we demonstrated that CCN2(IV) by activation of EGFR pathway, induced vascular inflammation by a mechanism mediated by NAD(P)H oxidase activation and $O_2^{\cdot-}$ production. Thus, these findings expand the current view of CCN2 and remark its important role in inflammatory cardiovascular diseases.

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN	5
1. Las enfermedades cardiovasculares.....	5
1.1. La hipertensión arterial.....	5
1.2. La aterosclerosis.....	6
2. Tratamientos actuales y nuevas dianas terapéuticas para las ECVs.	7
2.1. Inhibidores de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA-reductasa.....	7
2.2. Inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona.....	8
2.3. Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas. La importancia de las diferentes rutas y factores implicados en el daño cardiovascular.....	8
3. Procesos moleculares y celulares implicados en la patología vascular.....	9
3.1. Respuesta inflamatoria vascular.....	9
3.2. Aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno.....	13
3.3. Fibrosis vascular.....	17
4. Diversos factores implicados en la patología vascular.....	18
4.1. Angiotensina II.....	18
4.2. Factor de crecimiento transformante.....	19
4.3. Factor de crecimiento de tejido conectivo.....	20
4.4. CCN2 en patología vascular.....	23
OBJETIVOS.....	24
Objetivo general	24
Objetivos concretos.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
1. Modelos experimentales.	25
1.1. Modelo experimental de infusión de Angiotensina II en ratón.....	25
1.2. Modelo experimental de administración sistémica del fragmento C-terminal del factor de crecimiento de tejido conectivo CCN2(IV) en ratón.....	26
2. Estudios <i>in vitro</i>.	27
2.1. Obtención de los diferentes tipos celulares.....	27
2.2. Experimentos en células en cultivo.....	28
3. Estudios <i>ex vivo</i>.	29
3.1. Análisis de la unión de CCN2(IV) a la aorta por microscopía confocal.....	29
3.2. Estudios en aorta de ratón <i>ex vivo</i>	30

4. Estudios de actividad enzimática NAD(P)H oxidasa, de producción de radicales libres de oxígeno y de NO.....	30
4.1. Determinación de la actividad NAD(P)H oxidasa en aorta y en CMLVs en cultivo..	30
4.2. Medida de la producción de $O_2^{\cdot-}$ en células en cultivo por quimioluminiscencia con la sonda L-012.	30
4.3. Detección <i>in situ</i> de la producción de $O_2^{\cdot-}$ en aorta y en células en cultivo por microscopía confocal.	31
4.4. Medida de la producción de $O_2^{\cdot-}$ en aorta y en células en cultivo por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).	32
4.5. Medida de liberación de NO.	33
5. Estudios proteicos.	33
5.1. Técnicas de <i>western blot</i>	34
5.2. Técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.	35
5.3. Inmunofluorescencia en células en cultivo.	35
6. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos.	35
6.1. Evaluación del tejido conectivo en aorta.	35
6.2. Estudios inmunohistoquímicos.	35
7. Estudios genéticos.	36
8. Estudios de la reactividad vascular.....	37
9. Citometría de flujo.....	38
10. Análisis estadístico.	38
RESULTADOS.....	39
1. La sobreexpresión de CCN2 en un modelo experimental de daño vascular inducido por Ang II, está asociada a un aumento en la producción de ROS.....	39
2. CCN2(IV) regula procesos redox a nivel vascular.	40
2.1. CCN2(IV) aumentó la producción de $O_2^{\cdot-}$ en CMLVs y en CEs de ratón en cultivo, e incrementó la actividad NAD(P)H oxidasa en CMLVs.	40
2.2. CCN2(IV) aumentó la producción de $O_2^{\cdot-}$ y la actividad NADP(H) oxidasa en aorta de ratón <i>ex vivo</i>	43
2.3. CCN2(IV) reguló procesos redox en aorta de ratón <i>in vivo</i>	46
3. CCN2(IV) regula el tono vascular y produce disfunción endotelial.....	48
3.1. CCN2(IV) aumentó la respuesta contráctil vascular inducida por fenilefrina <i>ex vivo</i> , mediante procesos redox.	48
3.2. CCN2(IV) generó disfunción endotelial <i>in vivo</i>	49
4. CCN2(IV) regula la respuesta proinflamatoria a nivel vascular	50

4.1. CCN2(IV) aumentó la expresión de genes proinflamatorios y activó la ruta NF- κ B en CMLVs de ratón en cultivo.....	50
4.2. CCN2(IV) reguló la expresión de genes proinflamatorios y activó la ruta NF- κ B en aorta de ratón <i>in vivo</i> , sin alterar los niveles de factores profibróticos.	51
4.3. CCN2(IV) no aumentó el infiltrado inflamatorio a nivel vascular.....	53
5. CCN2(IV) activa la ruta NF-κB y regula genes proinflamatorios a nivel vascular, mediante procesos redox.....	54
5.1. CCN2(IV) reguló la activación de la ruta NF- κ B y de genes proinflamatorios en CMLVs de ratón mediante procesos redox.	54
5.2. CCN2(IV) reguló la activación de la ruta NF- κ B y de genes proinflamatorios en aorta de ratón <i>in vivo</i> mediante procesos redox.	57
6. El silenciamiento génico de Nox1 <i>in vivo</i> bloqueó las respuestas vasculares inducidas por CCN2(IV).	59
7. CCN2(IV) reguló respuestas vasculares mediante la activación del receptor de EGF.....	62
DISCUSIÓN.....	66
1. ROS y CCN2 en el daño vascular inducido por Ang II en aorta de ratón.	66
2. CCN2(IV) aumenta la producción de O ₂ ⁻ vía Nox1.....	67
3. CCN2(IV), vía Nox1, induce cambios en la respuesta contráctil vascular y genera disfunción endotelial.....	68
4. CCN2(IV) activa la ruta la ruta NF- κ B y aumenta la síntesis de genes proinflamatorios a nivel vascular.....	69
5. CCN2(IV), no aumenta la síntesis de genes profibróticos ni la síntesis de MEC en aorta de ratón a las 24 horas.	70
6. Interrelación entre CCN2(IV), ROS, NF- κ B y factores proinflamatorios en la pared vascular.....	71
7. EGFR regula la cascada de señalización inducida por CCN2(IV) en aorta de ratón y en CMLVs.....	72
8. Niveles circulantes de CCN2 en diversas patologías humanas	73
9. Nueva visión de CCN2(IV) como factor a tener en cuenta en la inflamación vascular	75
CONCLUSIONES.....	78
BIBLIOGRAFÍA	79
ANEXO.....	91

LISTADO DE ABREVIATURAS

2-OH-E+	2-hidroxietidio
ACV	Accidente cardiovascular
ACh	Acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AIT	Ataque isquémico transitorio
Ang II	Angiotensina II
ARA-II	Antagonista del receptor tipo I de Angiotensina II
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
BAFF	Factor activador de células B
BCA	Ácido bicinconínico
BCR	Receptor de células B
BMP	Proteína de la morfogénesis del hueso
BSA	Albúmina de suero bovino
CCN2/CTGF	Factor de crecimiento de tejido conectivo
CE	Célula endotelial
CMLV	Célula de músculo liso vascular
DAF-2 DA	4,5-diaminofluoresceína diacetato
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DHE	Dihidroetidio
DHR	Dominio de homología Rel
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTPA	Ácido dietilentriamina pentaacético
DTT	Ditiotreitol
E+	Etidio
ECV	Enfermedad cardiovascular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético

EEM	Error estándar de la media
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ET-1	Endotelina-1
FAD	Dinucleótido de flavina y adenina
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
GSH-Px	Glutation peroxidasa
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasa	Guanosin trifosfatasa
GTPc	Guanosín trifosfato cíclico
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
I.P.	Intraperitoneal
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
iECA	Inhibidor de la enzima de conversión de Angiotensina
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
IP-10	Proteína-10 inducible por interferón γ
JAK	Quinasa Janus
KHS	Solución de Krebs-Henseleit
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLox	Lipoproteína de baja densidad oxidada
LT β	Linfotoxina- β
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos-1
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinasa
Na ₃ VO ₄	Ortovanadato sódico

NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaF	Fluoruro sódico
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NIK	Quinasa inductora de NF-κB
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PFA	Paraformaldehído
PI3K	Fosfatidilinositol- 3-Quinasa
PKC	Proteína quinasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPAR-δ	Receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas
RANTES	Proteína expresada y secretada por células T normales reguladas tras la activación
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RS	Receptor <i>scavenger</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
SOD	Superóxido dismutasa
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TBS	Tampón tris salino
TCR	Receptor de células T
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
TH	Célula colaboradora
TLR	Receptor tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
TWEAK	Inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares-1

ABREVIATURAS

VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VWC	Factor Von Willebrand tipo C
WHO	Organización mundial de la salud
α -SMA	α -actina de músculo liso

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Las enfermedades cardiovasculares.

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs), abarcan todas las patologías que están ocasionadas por trastornos en el corazón o en los vasos sanguíneos y suponen la principal causa de morbilidad y mortalidad en el mundo (Global status WHO, 2010). Dentro de ellas se engloban diversos tipos de patologías, como la cardiopatía coronaria, los accidentes cerebro-vasculares (ACVs), las arteriopatías periféricas, las cardiopatías reumáticas, las cardiopatías congénitas o la insuficiencia cardíaca (Global atlas WHO, 2011). De todas las muertes registradas en el mundo en 2008, se ha estimado que el 30% de ellas (17,3 millones) se debieron a ECVs (Global status WHO, 2011), siendo las más predominantes la cardiopatía coronaria (7,3 millones) y los ACVs (6,2 millones) (Global atlas WHO, 2010). Además, se estima que en el año 2030 las ECVs seguirán siendo la principal causa de muerte a nivel mundial, con cerca de 23,3 millones, y se prevé que dentro de todas ellas las cardiopatías y los AVCs continuarán estando a la cabeza (Global status WHO 2011; Mathers y Loncar, 2006). Existen numerosos factores que pueden contribuir al desarrollo de las ECVs, algunos de ellos no manipulables, como factores genéticos, y otros de ellos sobre los que sí se puede interferir, como son la dieta, determinados hábitos (tabaquismo y alcoholismo), el sedentarismo, el colesterol, la diabetes, el sobrepeso o la hipertensión arterial.

1.1. La hipertensión arterial.

La hipertensión arterial se define como una elevación mantenida de la presión arterial por encima de los límites normales, y está englobada dentro de los principales factores de riesgo para las ECVs (Kjeldsen et al., 2014). Existen numerosos genes que participan en la patogenia de esta enfermedad, siendo los más relevantes los que codifican para proteínas implicadas en el transporte de agua e iones, en la hemodinámica renal o en los niveles de diversos factores como aldosterona, catecolaminas, renina, vasopresina, endotelina 1 (ET-1) o Angiotensina II (Ang II) (Martynowicz et al., 2014). Estos factores contribuyen al mantenimiento de la presión sanguínea formando parte de numerosos sistemas o estructuras, como el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), el sistema nervioso simpático o el endotelio vascular. Existen además otro tipo de factores externos, que pueden intervenir también en la regulación de la presión sanguínea, como son la ingesta de sodio, la falta de actividad física, el estrés o la obesidad (Martynowicz et al., 2014).

Esta enfermedad se caracteriza por causar cambios estructurales y funcionales en las arterias (remodelado vascular), como son la reducción del diámetro del lumen o el incremento del ratio entre la capa media y el lumen, lo que conduce a un aumento en la presión que ejerce la sangre sobre la pared de los vasos. En la aparición de estos cambios, intervienen diferentes procesos celulares entre los que se encuentran alteraciones en el crecimiento celular, hipertrofia de las células de músculo liso vascular (CMLVs) o sobreproducción de proteínas de matriz extracelular (MEC), como colágeno y fibronectina (Briones et al., 2009; Ruiz-Ortega et al., 2003;

Touyz, 2000a). Recientemente, se está centrando la atención en evaluar el papel que juega la respuesta inflamatoria vascular en la aparición y desarrollo de la disfunción endotelial que tiene lugar en la hipertensión. En este sentido, se están estudiando los factores que intervienen en dicha respuesta inflamatoria, entre los que se encuentran diferentes citoquinas y quimioquinas, como MCP-1, IL-8 o IP-10, ya que podrían ser de gran interés para el diseño de nuevas dianas terapéuticas y para una mejor comprensión de la hipertensión arterial (Martynowicz et al., 2014).

1.2. La aterosclerosis.

La mayoría de las ECVs comparten un proceso subyacente responsable, conocido como aterosclerosis. Se trata de una enfermedad vascular sistémica que suele aparecer en la infancia con la formación de la estría grasa, formada principalmente por células con un alto contenido en lípidos denominadas células espumosas, que altera el flujo sanguíneo. Con el tiempo, la estría grasa puede desarrollarse y dar origen a una placa aterosclerótica, la cual puede aumentar de tamaño y sufrir diferentes procesos de calcificación, hemorragia, ulceración, rotura y trombosis (Rafieian-Kopaei et al., 2014; Lusis, 2000).

El comienzo de la lesión aterosclerótica, es un deterioro en la capa endotelial de las arterias, denominado disfunción endotelial, que conlleva una alteración de sus funciones vaso-moduladoras. Esta disfunción incrementa la permeabilidad vascular, favoreciendo el paso de lipoproteínas de baja densidad (LDL) hacia el espacio sub-endotelial, donde alcanzan niveles superiores a los que puede regular el vaso para devolverlos a la sangre, y disminuyendo los niveles de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Este proceso incrementa el tiempo de permanencia de las LDL en el espacio sub-endotelial, aumentando con ello su probabilidad de oxidación por las especies reactivas del oxígeno (ROS) generadas en las CMLVs y/o en las células endoteliales (CEs), y dando lugar a las LDL-oxidadas (LDLox) (Rafieian-Kopaei et al., 2014; Tozer y Carew, 1997). El siguiente paso es la fase de inflamación, en la cual las LDLox activan la capa endotelial y estimulan la síntesis de moléculas de adhesión y factores quimioatrayentes, provocando la migración hacia la capa íntima de macrófagos que capturan las LDLox a través de sus receptores *scavengers* (RS). A continuación, los receptores de estos macrófagos, al no estar regulados por el contenido intracelular de colesterol, provocan una sobrecarga lipídica dentro de las células que conduce a la formación de las “células espumosas” que, en último término, mueren y liberan las LDLox que contienen creando una retro-alimentación positiva del proceso. Seguidamente, se produce una migración de CMLVs a la zona luminal, las cuales sintetizan y producen una acumulación de proteínas de MEC lo que da lugar a la formación de la denominada capa fibrosa, compuesta por las propias CMLVs, tejidos fibrosos ricos en colágeno, macrófagos y linfocitos T (Rafieian-Kopaei et al., 2014; Lusis, 2000) (Figura 1). Las placas pueden seguir progresando en complejidad mediante su calcificación o la ulceración de la superficie luminal, pudiendo crecer lo suficiente como para bloquear el flujo sanguíneo. Sin embargo, la complicación clínica más importante de esta enfermedad consiste en una oclusión aguda del vaso debida a la formación de un trombo o de un coágulo de sangre, normalmente

derivados de la ruptura o erosión de la placa, que acaba causando un infarto de miocardio o un ACV (Cheng et al., 2014; Rafieian-Kopaei et al., 2014; Lusis, 2000)

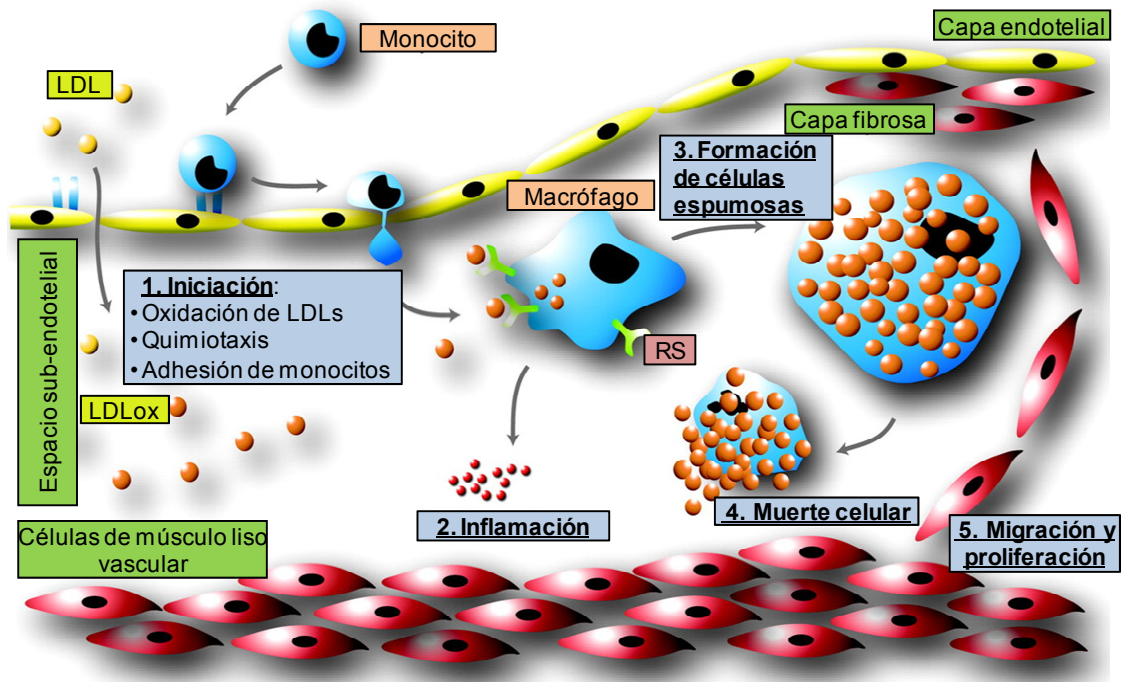


Figura 1. Esquema de las etapas del proceso aterosclerótico. Modificado de: de Winther et al., 2005.

Existen numerosos factores de riesgo que pueden intervenir en la formación y progresión del proceso aterosclerótico, entre los que se encuentran el tabaquismo, la diabetes, los niveles elevados de colesterol, el sedentarismo, el consumo excesivo de alcohol, el envejecimiento o, uno de los más importantes, la hipertensión arterial.

2. Tratamientos actuales y nuevas dianas terapéuticas para las ECVs.

Actualmente existen diferentes abordajes farmacológicos que intentan prevenir y/o reducir la progresión de las enfermedades cardiovasculares. Con el fin de actuar sobre los múltiples mecanismos y factores que participan en la aparición y el progreso de estas enfermedades, se han diseñado diferentes fármacos. Dentro del gran número de medicamentos que existen para el tratamiento de estas patologías, se va a realizar a continuación una breve descripción de dos de los tratamientos más utilizados en España para este propósito (Sanfélix-Gimeno et al., 2010).

2.1. Inhibidores de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA-reductasa.

El uso de inhibidores de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA-reductasa (HMG-CoA reductasa), enzima clave en la síntesis de colesterol, está indicado principalmente para el tratamiento de pacientes con dislipidemias (Stone et al., 2013). Estos medicamentos, conocidos como estatinas, producen una bajada de los niveles de las LDL, contribuyendo por tanto a prevenir la aparición y/o desarrollo de la aterosclerosis (Blum, 2014). Además de este efecto sobre la síntesis de colesterol, se han descrito otras acciones pleiotrópicas de las estatinas, generadas por los efectos que ejercen sobre diversas rutas celulares, lo cual ha servido para que estos fármacos sean también prescritos para la prevención y tratamiento de otras enfermedades cardiovasculares. Algunos de

estos efectos pleiotrópicos incluyen, la disminución de la oxidación de las LDL en el espacio sub-endotelial y de su captura por los macrófagos (Egashira et al., 1994; Eichstädt et al., 1995), la bajada de la expresión de moléculas de adhesión (Weber et al., 1997), el descenso en la proliferación de CMLVs (Negre-Aminou et al., 1997) o la reducción de marcadores sistémicos de inflamación (Ridker et al., 1999; Jialal et al., 2001; Futterman y Lemberg, 2004).

2.2. Inhibidores del sistema renina-angiotensina-aldosterona

El SRAA juega un papel esencial en la fisiopatología de la hipertensión y está estrechamente ligado a los eventos cardio- y cerebrovasculares (Dézsi, 2014). Es por ello, que el uso de antagonistas del receptor tipo I de la Ang II (ARA-II) o de inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina (iECAs), son dos de los fármacos más establecidos para el tratamiento de la hipertensión arterial (Dézsi, 2014; NICE, 2011). Adicionalmente, diferentes estudios han demostrado los efectos beneficiosos de estos fármacos en el tratamiento de diversas patologías cardiovasculares, por lo que se ha ampliado su uso para el manejo de otras patologías como el remodelado del ventrículo izquierdo postinfarto de miocardio, la nefropatía diabética, la aterosclerosis o el síndrome metabólico (Mancia et al., 2013; Stone et al., 2014). Estos medicamentos presentan efectos beneficiosos al ser capaces de inhibir diferentes mecanismos y respuestas celulares activados por la acción de la Ang II, entre los que destacan, la producción de estrés oxidativo o el aumento de la migración, adhesión, proliferación, inflamación y remodelado celular (Pacurari et al., 2014), todos ellos procesos claves en el desarrollo de diferentes patologías cardiovasculares.

2.3. Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas. La importancia de las diferentes rutas y factores implicados en el daño cardiovascular.

Los fármacos descritos anteriormente, al igual que la mayoría de las estrategias terapéuticas utilizadas actualmente en clínica, actúan regulando diferentes procesos y factores que están altamente relacionados entre sí, como son el estrés oxidativo, la inflamación, la migración, la adhesión, la proliferación o la fibrosis. De este modo, se han conseguido reducir, de manera más que notable, el número de muertes de origen cardiovascular. Sin embargo, pese al gran avance que se ha producido en las últimas décadas, la gran tasa de muerte que siguen ocasionando los eventos cardiovasculares hace que el estudio de los mecanismos que participan en el desarrollo de estas enfermedades siga siendo actualmente uno de los principales focos de investigación y un objetivo prioritario para el sistema de salud. La gran diversidad y complejidad de los mecanismos y factores implicados en estas patologías hace que su tratamiento no resulte sencillo ya que, al existir una alta interconexión entre muchos de ellos, cabe la posibilidad de que un tratamiento tenga al mismo tiempo efectos beneficiosos y perjudiciales o que sea necesaria la combinación de varios de ellos para conseguir un efecto mejor (Bays, 2014). Es por ello, que sigue siendo necesario estudiar y profundizar aún más en los mecanismos y factores que intervienen en la aparición y desarrollo de las patologías cardiovasculares, con el fin de elaborar nuevos abordajes farmacológicos o de detectar nuevas dianas terapéuticas.

3. Procesos moleculares y celulares implicados en la patología vascular.

Existen numerosos procesos celulares y moleculares que participan en el daño vascular. A continuación se detallan algunos de ellos que se han considerado de especial interés para el trabajo que se pretende realizar, como son la respuesta inflamatoria, el aumento en la producción de ROS y la fibrosis.

3.1. Respuesta inflamatoria vascular.

El proceso inflamatorio se define como una respuesta no específica de un tejido ante una agresión producida por diferentes factores mecánicos, químicos o biológicos y tiene como finalidad la supresión del agente causante del daño, la eliminación del tejido dañado y su reparación por tejido sano (Cachofeiro Ramos et al., 2004). Estudios epidemiológicos han demostrado que existe una importante conexión entre diferentes enfermedades inflamatorias crónicas y enfermedades cardiovasculares. En este sentido, se ha descrito un aumento en la incidencia de infarto de miocardio en pacientes diagnosticados con artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico o psoriasis (Klingenberg y Hansson, 2009). Estos datos contribuyen a resaltar la importancia que tiene la respuesta inflamatoria en el desarrollo y la progresión de diversas patologías vasculares, como la vasculitis, los aneurismas, la hipertensión o la aterosclerosis (Luan et al., 2015; Klingenberg y Hansson, 2009; Carbone y Montecucco, 2015).

3.1.1. Características del proceso inflamatorio en el vaso

Independientemente del factor que la active, la respuesta inflamatoria es muy similar en todos los casos y conlleva la sucesión de diferentes etapas: iniciación, consolidación y resolución (Cachofeiro Ramos et al., 2004). Bajo circunstancias patológicas, el espacio sub-endotelial del vaso puede convertirse en un entorno de inflamación en el que se secretan citoquinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-6 o TNF- α , que conducen a la fase de iniciación de la inflamación. Estas citoquinas activan a las CEs del vaso, las cuales a su vez expresan moléculas de adhesión y conducen a un reclutamiento leucocitario. El reclutamiento comienza con el rodado leucocitario sobre la pared vascular, el cual viene regulado por la familia de proteínas selectinas y sus ligandos, hasta que los leucocitos encuentran un estímulo que dispara la activación dependiente de adhesión y terminan fijándose a la pared vascular (Butcher, 1991; Medzhitov, 2008). Existen dos moléculas de la familia de las inmunoglobulinas de adhesión endotelial, la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1), las cuales se encuentran activadas en la pared vascular de los vasos dañados y se encargan de interactuar con las integrinas de los leucocitos que se encuentran en la fase de rodado para mediar su fijación a la pared (Carlos y Harlan, 1994; Bamias et al., 2013). Debido a la importancia que tienen estos factores en el desarrollo de la inflamación vascular, existen diversos estudios que han utilizado los niveles plasmáticos elevados de las formas solubles de E-selectina, ICAM-1 y VCAM-1 como marcadores de disfunción endotelial en pacientes con fallo cardíaco crónico, con o sin diabetes (Drexler et al., 1995; Gasic et al., 1999; Tsutamoto et al., 2000), con diabetes Tipo 1

normotensa (Schalkwijk et al., 2000) y con hipertensión esencial con tolerancia disminuida a la glucosa (Ferri et al., 1998).

El siguiente paso del reclutamiento leucocitario, es la trans migración de los leucocitos fijados en la pared hacia el interior del vaso, en la que tienen un papel muy importante un tipo determinado de citoquinas denominado quimioquinas, las cuales son un tipo de citoquinas que presentan propiedades quimiotácticas para tipos específicos de leucocitos (Adams y Lloyd, 1997; Charo y Taubman, 2004). En este punto se produce la fase de consolidación de la inflamación, ya que las células infiltradas continúan secretando citoquinas y quimioquinas y contribuyen a mantener y aumentar el proceso inflamatorio. Dentro de las quimioquinas, existen diferentes tipos atendiendo a su estructura y función, siendo la familia más grande la formada por las quimioquinas de tipo CC, las cuales reciben este nombre por tener los 2 primeros residuos conservados de cisteína (de los cuatro característicos que presentan las quimioquinas) adyacentes uno de otro. Dos de las quimioquinas tipo CC más importantes en el desarrollo de la inflamación vascular son la proteína expresada y secretada por células T normales reguladas tras la activación (RANTES/CCL5) y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1/CCL2) (Charo y Taubman, 2004). A nivel vascular se ha descrito MCP-1 como un factor muy importante en el reclutamiento de monocitos desde la sangre al interior de lesiones ateroscleróticas tempranas, en el desarrollo de hiperplasia intimal postangioplastia, en la vasculogénesis y en la trombosis (Charo y Taubman, 2004).

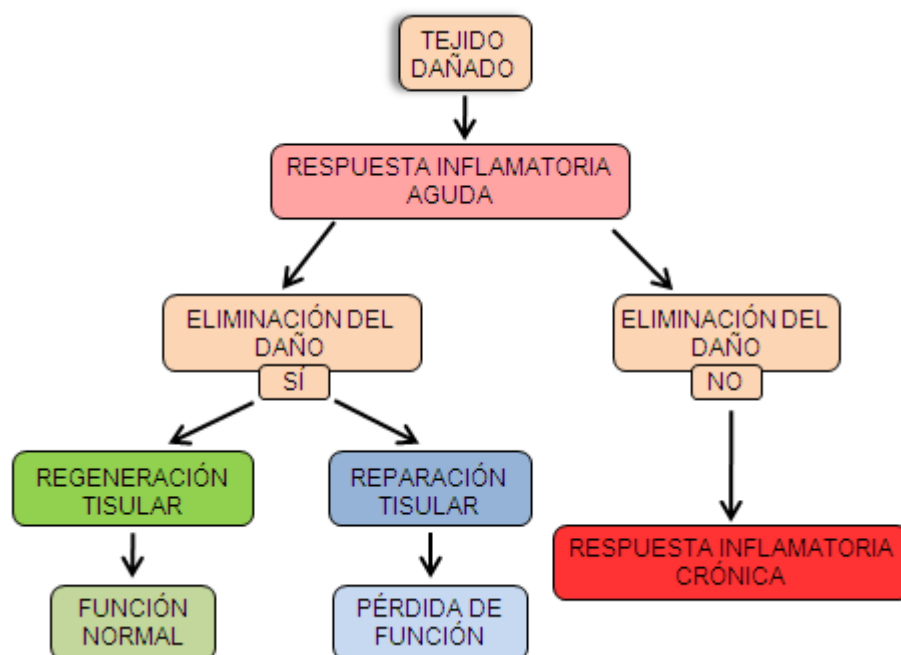


Figura 2. Esquema de la evolución del proceso inflamatorio.

En último término tiene lugar la fase de resolución, caracterizada por conducir a la eliminación del agente causante del proceso inflamatorio y a la reparación del tejido afectado. La reparación puede involucrar dos procesos distintos, por un lado la regeneración, que consiste en el recambio de células dañadas por células del mismo tipo sin producir una pérdida de función en el

tejido, y por otro, el recambio por tejido conectivo, el cual origina una cicatriz permanente (Medzhitov, 2008; Medzhitov, 2010) y conduce a una pérdida de función. Sin embargo en determinadas situaciones, como en el proceso aterosclerótico, tiene lugar un tipo de inflamación conocido como inflamación crónica, la cual consiste en una activación de la respuesta inflamatoria sostenida en el tiempo (Medzhitov, 2008; Medzhitov, 2010) (Figura 2).

3.1.2. Ruta de señalización del factor nuclear- κ B en inflamación

Uno de los mecanismos moleculares más importantes en la regulación del proceso inflamatorio, es el mediado por la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) (Tak y Firestein, 2001). La familia del factor de transcripción NF- κ B, en mamíferos, consiste en cinco proteínas, RelA (conocido también como p65), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- κ B1) y p100/52 (NF- κ B2), que se asocian entre sí dando lugar a diferentes complejos activos formados por homo y heterodímeros (Oeckinghaus y Ghosh, 2009; Sanz et al., 2010; Hayden y Ghosh, 2012). Todas estas proteínas comparten un dominio de homología Rel (DHR) en su región N-terminal (Baldwin, 1996; Oeckinghaus y Ghosh, 2009), el cual les sirve para anclarse a las secuencias consenso NF- κ B presentes en el ADN, para formar los diferentes dímeros y para interaccionar con los inhibidores I κ B (Oeckinghaus y Ghosh, 2009). Las proteínas p50 y p52 son sintetizadas como precursores p105 y p100 respectivamente, y son procesados parcialmente por el proteasoma para eliminar su mitad C-terminal y dar lugar a las proteínas activas. Por su parte, p65, c-Rel y RelB se sintetizan como proteínas activas y poseen dominios de transactivación C-terminal que les sirven para activar la transcripción de genes diana de NF- κ B (Beinke y Ley, 2004; Hayden y Ghosh, 2012). En condiciones normales la mayoría de las células presentan en su citoplasma los dímeros de NF- κ B en una conformación inactiva. Este hecho se debe a la unión de la región DHR de los dímeros con los dominios de repetición de anquirina de alguna de las proteínas tipo I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , I κ B δ y Bcl-3) o de las proteínas precursoras p100 y p105 (Oeckinghaus y Ghosh, 2009).

3.1.2.1. Ruta clásica

La ruta más conocida para la activación de NF- κ B, es la que se denomina como ruta “canónica” o “clásica”. Esta ruta puede ser inducida por diversos mediadores de la respuesta inmune innata y adaptativa, entre los que se encuentran diferentes citoquinas proinflamatorias, como TNF- α e IL-1 β (Martin y Fresno, 2000), la activación de receptores TLR (O’Neill, 2006) o de receptores de antígenos (TCR y BCR) (Weil e Israël, 2004), el estrés oxidativo o la Ang II (Oeckinghaus y Ghosh, 2009; Ruiz-Ortega et al., 2006) (Figura 3)

Cuando se produce un estímulo, el primer paso para la activación de esta ruta es la fosforilación y posterior degradación de I κ B α . Esta fosforilación tiene lugar mediante la participación del complejo IKK (quinasa de I κ B), el cual está formado por dos proteínas quinasas, IKK1 (denominada también IKK α) e IKK2 (conocida también como IKK β) que componen la subunidad catalítica y por la subunidad estructural NEMO (modulador esencial de NF- κ B, o IKK γ) el cual es necesario para unir el complejo IKK con las señales que preceden a su activación

(Beinke y Ley, 2004; y Karin, 2006; Karin y Ben-Neriah, 2000; Bonizzi et al., 2004). Una vez que I κ B α es fosforilada por el complejo IKK, es ubiquitinada y posteriormente degradada por el proteosoma 26s. Finalmente, el dímero p50/p65 queda libre y activado, y se transloca al núcleo donde regula la expresión de diversos genes implicados en la respuesta inmune e inflamatoria, como MCP-1, RANTES, TNF- α , ICAM-1 o IL-6 (Oeckinghaus y Ghosh, 2009; Sanz et al., 2010).

3.1.2.2. Ruta alternativa

En los últimos años, se ha descrito una activación de la ruta NF- κ B diferente a la descrita clásicamente, y se ha denominado ruta “no canónica” o “alternativa”. Esta ruta es independiente de NEMO y se induce por miembros específicos de la familia de la citoquina TNF, como son BAFF, LT β , TWEAK o el ligando CD40. (Oeckinghaus y Ghosh, 2009; Sanz et al., 2010; Xiao et al., 2006). En la activación de esta ruta participa la quinasa inductora de NF- κ B (NIK), la cual fosforila el homodímero IKK α y desencadena su interacción con la proteína p100 que se encuentra unida a RelB. Esta interacción conlleva la fosforilación de p100, la cual es procesada en el proteosoma para dar lugar a p52. Finalmente, el complejo p52/RelB activo se libera y se transloca al núcleo para regular la síntesis de diferentes factores, como las quimioquinas CCL19, CCL21, CXCL12 y CXCL13 (Sanz et al., 2010) (Imagen 3).

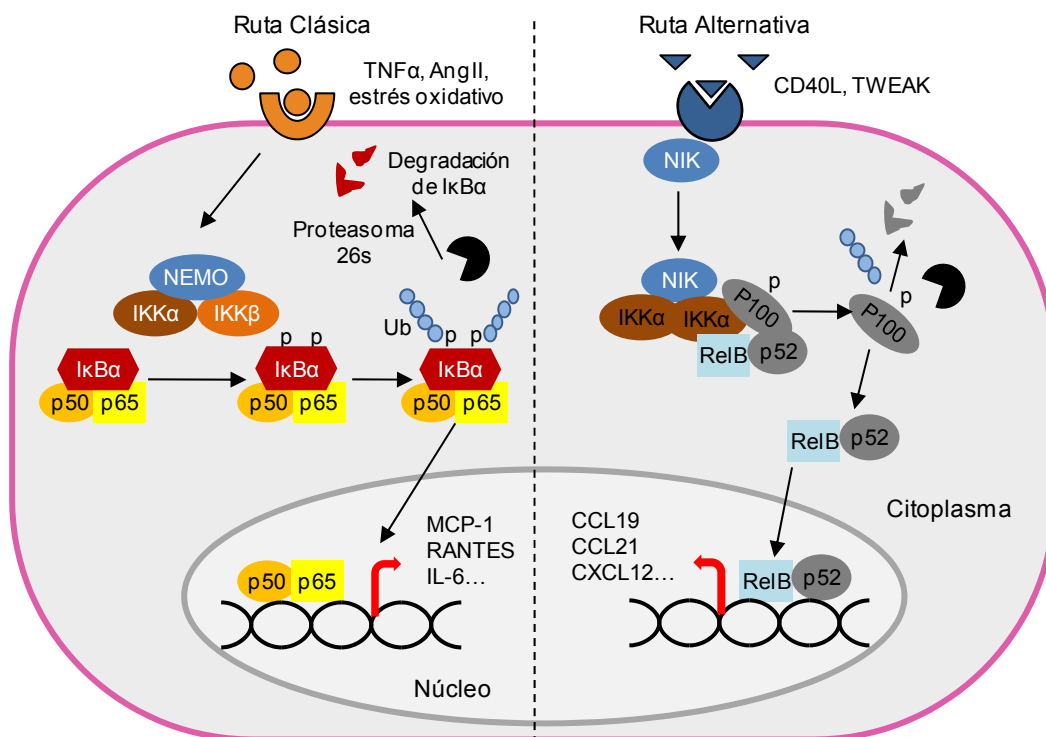


Figura 3. Esquema de la activación de NF- κ B por la vía clásica y alternativa.

3.1.2.3. NF- κ B en la enfermedad vascular

La activación de la ruta NF- κ B se ha descrito como un mecanismo involucrado en el remodelado vascular (Saito et al., 2013), y por tanto, con un papel importante en el desarrollo y la regulación de diferentes patologías vasculares como la hipertensión arterial, la aterosclerosis, la hipertrofia cardíaca, el infarto de miocardio o la formación de aneurismas (Van der Heiden et al., 2010; de Winther et al., 2005; Gomolak y Didion, 2013; Bhat et al., 2014; Saito et al., 2013).

3.2. Aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno

3.2.1. Definición y clasificación de las especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas del oxígeno (ROS), así como las especies reactivas del nitrógeno (RNS), son una clase de moléculas que derivan del metabolismo normal de la célula. Las ROS son entidades químicas reactivas que se producen como intermediarios en las reacciones de reducción-oxidación (redox) derivadas del paso de O_2 a H_2O y comprenden dos grupos diferentes. Por un lado se encuentran los radicales libres, los cuales son moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en los orbitales atómicos, y por otro lado están las especies reactivas que no contienen electrones desapareados, las cuales, a pesar de ser más estables y menos reactivas, también son agentes oxidantes y pueden convertirse fácilmente en radicales libres. Algunos de los representantes más importantes del primer grupo son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), el radical peróxido (RO_2^{\cdot}) o el radical alcoxil (RO^{\cdot}), mientras que dentro de los ROS no radicales se encuentran, entre otros, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el ozono (O_3) o el oxígeno singlete (1O_2) (Figura 4) (Valko et al., 2007; Dröge, 2002).

Los ROS ejercen un papel importante a nivel celular dependiendo de la concentración a la que se encuentren. Normalmente, a bajas concentraciones, los ROS pueden modular rutas de señalización celular específicas, siendo esta acción conocida como señalización redox (Sirker et al., 2011). Sin embargo, cuando los niveles de ROS superan las defensas antioxidantes endógenas, estado conocido como estrés oxidativo, son capaces de alterar químicamente diferentes biomoléculas, como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, modificando su estructura y su función (McCall y Frei, 1999; Valko et al., 2007). Tanto la señalización redox como el estrés oxidativo, juegan un papel muy importante en numerosas enfermedades cardiovasculares como son la aterosclerosis, la hipertensión o el fallo cardíaco (Dröge, 2002; Valko et al., 2007; Sirker et al., 2011).

Dentro de los RNS, uno de los más importantes a nivel vascular es el óxido nítrico (NO^{\cdot}), ya que tiene un importante papel como agente vasodilatador en la pared vascular. Gracias a su unión al hierro de la enzima guanilato ciclasa, el NO puede activar la catalización de GTP para producir GMPc. Este último, actúa como segundo mensajero celular y activa diferentes procesos biológicos que conducen a una bajada en los niveles de calcio intracelular y con ello a una dilatación de la pared arterial (Radomski et al., 1987; Valko et al., 2007).

PRINCIPALES ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DEL OXÍGENO (ROS) Y DEL NITRÓGENO (RNS)			
RADICALES LIBRES		ESPECIES REACTIVAS NO RADICALES	
SUPERÓXIDO	$O_2^{\cdot -}$	PERÓXIDO HIDRÓGENO	H_2O_2
HIDROXILO	OH^{\cdot}	HIDROPERÓXIDOS	$ROOH$
ALCOXI	RO^{\cdot}	HIPOCLORITO	$ClO^{\cdot -}$
PEROXI	RO_2^{\cdot}	OXÍGENO SINGLETE	1O_2
CARBONATO	$CO_3^{\cdot -}$	OZONO	O_3
OXIDO NÍTRICO	NO^{\cdot}	PEROXINITRITO	$ONOO^{\cdot -}$
DIOXIDO NÍTRICO	NO_2^{\cdot}		

Figura 4. Principales especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS).

3.2.2. Principales fuentes de producción de ROS.

Se han descrito numerosas fuentes de producción de ROS a nivel celular, entre las que se encuentran la cadena de transporte electrónico en la mitocondria, el metabolismo del citocromo P450, la acción de la ciclooxigenasa, la xantina oxidasa, la mieloperoxidasa, la lipoxigenasa, la hemoxigenasa, la óxido nítrico sintasa o la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NAD(P)H) oxidasa. Sin embargo, solo algunas de ellas se han relacionado con el desarrollo de patologías vasculares, destacando sobre todo la NAD(P)H oxidasa (Lassègue y Clempus, 2003; Cohen y Tong, 2010).

Durante mucho tiempo, la producción de $O_2^{\cdot -}$ por la NAD(P)H oxidasa se consideró una singularidad que aparecía solo en los fagocitos profesionales. Sin embargo, posteriormente, se descubrieron seis proteínas homólogas a la subunidad del citocromo de esta NAD(P)H oxidasa presente en los fagocitos (Nox2), y se las denominó como Nox1, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 y Duox2. Actualmente, a este conjunto de proteínas se les conoce como familia Nox de NAD(P)H oxidasas (San Martín y Griendling, 2014; Bedard y Krause, 2007). Todos los miembros de la familia de Nox son proteínas transmembrana que transportan electrones entre las membranas biológicas y reducen el oxígeno generando anión superóxido. Debido a esta funcionalidad, existen propiedades estructurales conservadas en todos los miembros de la familia como son la presencia de dominios de unión NAD(P)H y FAD en la región C-terminal citoplasmática o de seis dominios transmembrana altamente conservados (Bedard y Krause, 2007). Sin embargo, a parte de la subunidad de membrana que les da nombre, presentan otra serie de subunidades que les diferencian, como son la subunidad de membrana p22phox que únicamente aparece en Nox1/2/3 y 4, las subunidades NOXO1 y NOXA1, presentes en Nox1 y Nox3, las subunidades p40, p47 y p67 phox, que son específicas de Nox2, la GTPasa RAC presente en Nox1/2 y 3, los dominios de

unión a Ca^{2+} , característicos de Nox5 y Duox1 y 2, o el dominio homólogo a peroxidasa, presente únicamente en las Duox1 y 2 y que les confiere su capacidad dual de producir tanto O_2^- , a través del dominio homólogo a Nox1, como H_2O_2 , gracias al dominio homólogo a peroxidasa. Todas estas variaciones en la conformación hacen que los miembros de la familia tengan diferencias en cuanto a su función y actividad. (Rada y Leto, 2008) (Figura 5).

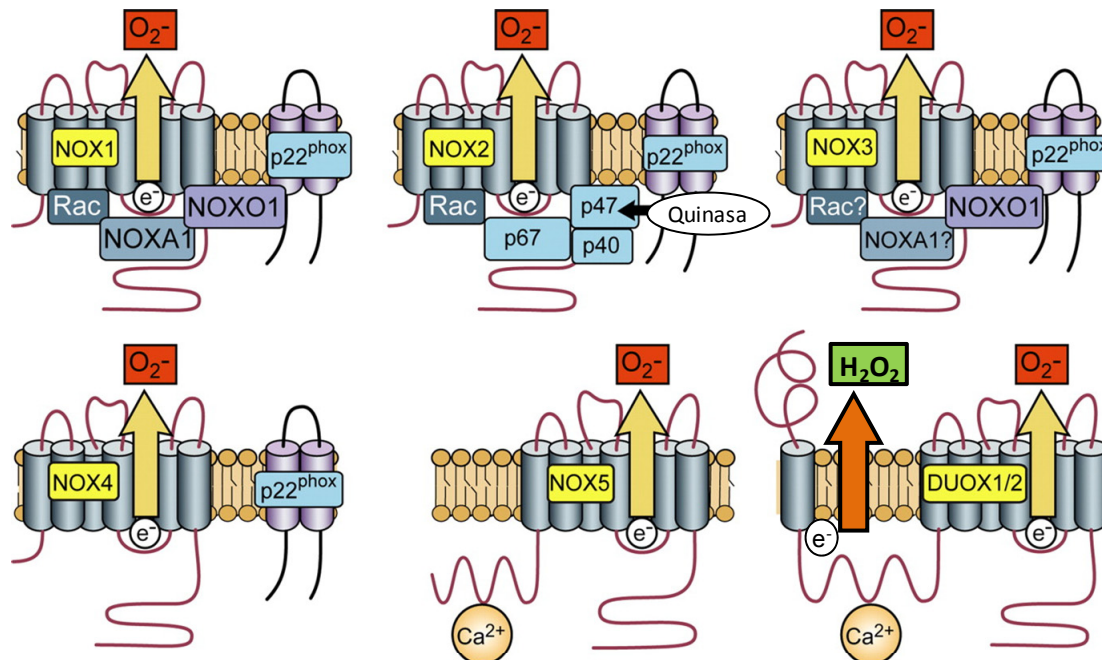


Figura 5. Familia de proteínas Nox (Modificada de Bedard y Krause, 2007).

3.2.3. Principales sistemas antioxidantes

Para mantener las ROS dentro de los niveles adecuados e impedir que se genere el denominado estrés oxidativo, las células disponen de una serie de mecanismos, enzimáticos o no, que se encargan de la prevención de la síntesis de ROS, de su destrucción una vez se han sintetizado o de la reparación de los daños ocasionados por ellos (Davies, 2000; Dröge, 2002; Valko et al., 2007).

3.2.3.1. Mecanismos antioxidantes enzimáticos

Dentro de este grupo, probablemente la enzima más conocida es la superóxido dismutasa (SOD), la cual tiene como función catalizar la dismutación del O_2^- en O_2 y H_2O_2 (Davies, 2000; Dröge, 2002; Valko et al., 2007). Dependiendo de la naturaleza del anión que presentan en su sitio activo, de su composición aminoacídica y del número de subunidades y cofactores que las forman, se distinguen tres isoformas de SOD en humanos: una citosólica (Cu/Zn-SOD; o SOD1), una mitocondrial (Mn-SOD; o SOD2) y una extracelular (EC-SOD; o SOD3). La reacción que cataliza la SOD da como resultado la producción de H_2O_2 , el cual debe ser rápidamente eliminado debido a la alta toxicidad celular que presenta. Para este fin, las células poseen otras dos enzimas cuya finalidad es la reducción del H_2O_2 a O_2 y H_2O , la catalasa y la glutatión peroxidasa (GSH-Px) (Davies, 2000; Urso y Clarkson, 2003; Aguilo et al., 2005).

3.2.3.2. Mecanismos antioxidantes no enzimáticos

En este grupo se engloban una serie de sustancias que se oxidan antes que los potenciales compuestos oxidables celulares (ADN, lípidos o proteínas) aún encontrándose en menor concentración que estos. Gracias a esta oxidación consiguen retrasar, inhibir o prevenir la oxidación de componentes celulares, y rebajar los niveles de ROS. Dentro de este sistema aparecen numerosos compuestos de bajo peso molecular, entre los que destacan el glutatión reducido, la vitamina A (trans-retinol/ β -caroteno), la vitamina C (ácido ascórbico) y la vitamina E (α -tocofenol). Además de estos, también se encuentran dentro de este grupo los flavonoides, el ácido úrico, los ácidos fenólicos, la bilirrubina, algunos azúcares y aminoácidos, la ubiquinona o la melatonina (Muñoz et al., 2010; McCall y Frei, 1999; Urso y Clarkson, 2003; Aguiló et al., 2005).

3.2.4. Papel de las ROS en la regulación de la señalización celular

Aunque, como se ha indicado anteriormente, las ROS están relacionadas principalmente con el daño celular, también tienen otra función muy importante a nivel fisiológico ya que actúan como segundos mensajeros de la señalización intracelular (Dröge, 2002; Valko et al, 2007). Las ROS son liberadas en bajas concentraciones por la mayoría de tipos celulares, bien como consecuencia del metabolismo celular o bien como respuesta a diferentes estímulos como citoquinas (TNF- α , IL-1 β), factores de crecimiento (EGF, PDGF, VEGF, TGF- β) u otros factores como el péptido vasoactivo Ang II.

Existen numerosos estudios donde se describe la implicación de las ROS en la activación de diferentes rutas de señalización celular, como la de las MAPKs, o la de diferentes factores de transcripción, como NF- κ B (Sun y Oberley, 1996; Dröge, 2002; Valko et al., 2007). Diferentes estudios han revelado que las ROS inducen la liberación de calcio de las reservas intracelulares, lo cual resulta en la activación de diferentes proteínas quinasas, como la proteína quinasa C (PKC), la cual conduce a la activación de diversos factores de transcripción (Valko et al., 2007). Otro de los mecanismos en los que se ha observado la mediación de ROS ha sido la activación del receptor de VEGF a través de la inducción de la ruta PI3K/Akt en CMLVs de ratón (Valko et al., 2007).

3.2.5. Las ROS en el sistema cardiovascular.

Dentro de las ROS, a nivel vascular, hay que destacar el papel importante que juega el $O_2^{\cdot-}$, ya que se han descrito numerosos procesos en los que puede intervenir, como son el aumento del tono vascular mediante la oxidación y consecuente disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), la activación de la respuesta inflamatoria, el aumento en la actividad de las metaloproteinasas de matriz y la regulación del crecimiento o la apoptosis celular (Lassègue et al., 2001; Griendling, 2004; Brandes, 2010). Todos estos procesos en los que se ha descrito la participación del $O_2^{\cdot-}$ tienen un rol importante en la aparición y el desarrollo de diferentes enfermedades cardiovasculares como la hipertensión o la aterosclerosis, en la cual participa oxidando lipoproteínas, limitando la disponibilidad vascular de NO y promoviendo la expresión de citoquinas y moléculas de adhesión celular (Touyz, 2000b; Brandes y Schröder, 2008).

La familia de enzimas Nox ha sido descrita como la primera fuente de producción de $O_2^{\cdot -}$ en los vasos sanguíneos. Los miembros de esta familia se encuentran funcionalmente activos en todos los tipos celulares presentes en la pared vascular, incluidas las CEs, las CMLVs, los fibroblastos y los monocitos/macrófagos (Cohen y Tong, 2010; Lassègue y Clempus, 2003). De los siete miembros que componen la familia, solo cuatro de ellos (Nox1,2,4 y 5) se expresan en la pared vascular (Konior et al., 2014; Sirker et al., 2011; Brandes, 2010; Lassègue y Clempus, 2003), siendo Nox1 y Nox4 dos de las más estudiadas a este nivel (Brandes RP, 2010). Existen diferencias en cuanto a la expresión de estas dos enzimas, ya que mientras que Nox4 se expresa de manera ubicua en los diferentes tipos celulares presentes en el vaso, Nox1 se expresa mayoritariamente en las CMLVs (Sirker et al., 2011). Además, también difieren en cuanto a su localización y activación, de tal forma que Nox4 se localiza mayoritariamente en el retículo endoplasmático y se encuentra activada constitutivamente, mientras que Nox1 se localiza en la membrana plasmática y su activación es dependiente de algún agonista y de su subunidad citoplasmática activadora (Brandes, 2010).

3.3. Fibrosis vascular

La fibrosis es un proceso normal de cicatrización de las heridas que se activa en respuesta ante algún daño para mantener la arquitectura e integridad funcional del tejido. Sin embargo, si el daño se mantiene en el tiempo, se puede producir una desregulación de los procesos normales de síntesis y degradación de la MEC, de tal manera que se aumenta la síntesis y se disminuye la degradación, lo que conduce a un exceso en la acumulación de MEC (Wynn, 2008). Debido a la importancia que tiene la fibrosis en el desarrollo de numerosas patologías humanas, existen múltiples estudios que se han centrado en investigar los mecanismos moleculares que regulan este proceso, siendo actualmente un objetivo central de muchos grupos de investigación internacionales en diversas áreas y de algunas compañías farmacéuticas.

La fibrosis vascular, presente en fases avanzadas de diferentes patologías vasculares como la aterosclerosis, la restenosis vascular, la hipertrofia cardíaca o el fallo cardíaco postinfarto de miocardio (Ruiz-Ortega et al., 2007), está mediada por cambios estructurales en las arterias, que incluyen la hipertrofia de las CMLV, el acumulo de colágeno y fibronectina, o la destrucción de las fibras elásticas. El origen de estos cambios se ha atribuido tanto a cambios hemodinámicos asociados al estrés mecánico, como a factores de crecimiento, entre los que se encuentran el TGF- β o la Ang II (Ruiz-Ortega et al., 2007).

El TGF- β está considerado como el factor más relevante en la regulación de la fibrosis (Böttinger, 2007; Wang et al., 2005; Hundae y McCullough, 2014), ya que contribuye a la acumulación de MEC al ser capaz de inducir la síntesis de las proteínas que la componen y inducir proteínas que inhiben su degradación (Varga y Jimenez, 1986; Leask y Abraham, 2004). Otro de los factores que tienen un papel muy importante en el proceso fibrótico es la Ang II, ya que puede actuar como una auténtica citoquina y regular la arquitectura e integridad de la pared vascular mediante el control del crecimiento celular, de la producción de ROS, de la inflamación y de la propia fibrosis (Ruiz-ortega et al., 2003; Touyz y Schiffrin, 2000; Ruiz-Ortega et al., 2001).

Además del TGF- β y la Ang II; existen diversos estudios que destacan la importancia que tiene el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF/CCN2) en el desarrollo de la fibrosis, ya que actúa como mediador tanto de los dos factores mencionados como de la ET-1, la cual es un importante agente vasoactivo que interviene en la regulación del tono vascular regulando procesos como la vasoconstricción, la inflamación o la fibrosis. (Grotendorst, 1997, Rupérez et al., 2003, Sánchez-López et al., 2009a y 2009b, Rodríguez-Vita et al., 2005a y 2005b). Varios grupos han demostrado que el bloqueo de CCN2 mediante oligonucleótidos antisentido inhibe la fibrosis *in vitro* (Rupérez et al., 2003) y en modelos experimentales de fibrosis (Leask, 2009) y que la sobreexpresión de CCN2 local incrementa el daño vascular postangioplastia (Kundi et al., 2009). A pesar de estos datos, la traslación del tratamiento con inhibidores de CCN2 a la clínica, a día de hoy, está todavía muy lejos.

4. Diversos factores implicados en la patología vascular

Al igual que sucede con los procesos, existen numerosos mediadores que participan en el desarrollo y evolución de las enfermedades cardiovasculares. Algunos de estos factores se han considerado de especial interés debido a los numerosos estudios que describen su implicación en estas enfermedades y a la interconexión que existe entre ellos, por lo que serán descritos a continuación.

4.1. Angiotensina II.

La Angiotensina II (Ang II), es un octapéptido derivado de la proteólisis de la Angiotensina I por la enzima convertidora de angiotensina (ECA). La Ang II es la molécula efectora primaria del SRAA y, como tal, juega un papel muy importante en la regulación de la presión arterial y en la etiología de la hipertensión (Iwanciw et al., 2003). La Ang II, aparte de ser un potente agente vasoconstrictor, también participa en otros procesos importantes como la regulación del crecimiento celular, la inflamación o la fibrosis, lo que la convierte en una auténtica citoquina con un papel muy importante en la aparición y el desarrollo de muchas patologías cardiovasculares (Nguyen Dinh Cat et al., 2013; Ruiz-Ortega et al., 2001; Ruiz-Ortega et al., 2003, Touyz y Schiffrin, 2000).

Las acciones de la Ang II están mediadas por dos subtipos de receptores de membrana específicos, los receptores AT1 y AT2. Son receptores acoplados a proteínas G que pertenecen a la familia de receptores con 7 dominios transmembrana. Los receptores AT1 median muchas de las acciones más importantes de la Ang II a nivel cardiovascular, como son la vasoconstricción, el remodelado cardíaco y la muerte o supervivencia celular (Balakumar y Jagadeesh, 2014; Baker et al., 1992). La regulación de estas acciones por los receptores AT1, se realiza mediante la activación de diferentes señales intracelulares, entre las que se encuentran, la ruta de las proteínas Smad, la vía del NF- κ B, la movilización de calcio, o la activación de diversas proteínas quinasas, como la PKC y la cascada de MAPKs (Mehta y Griendling, 2007; Griendling et al., 1997; Balakumar y Jagadeesh, 2014). En el otro lado, se encuentran los receptores AT2, los cuales se ha descrito que median respuestas antiproliferativas y proapoptóticas inducidas por Ang II en las

CMLVs, principalmente antagonizando las respuestas mediadas por los receptores AT1 (Mehta y Griendling, 2007).

La Ang II destaca por ser uno de los principales estímulos para la producción de ROS en las distintas capas de la pared vascular, ya que es capaz de inducir el aumento de la actividad enzimática de las NAD(P)H oxidasas (Rajagopalan et al., 1996; Balakumar y Jagadeesh, 2014). Asimismo, se ha descrito que en monocitos, macrófagos, CMLVs y CEs, Ang II puede activar la ruta NF- κ B e inducir con ello la producción de moléculas de adhesión celular, como VCAM-1, ICAM-1 y Selectina-E, y de diversas citoquinas como RANTES, IL-8, MCP-1 e IL-6, (Piqueras et al., 2000; Mehta y Griendling, 2007). Además, se ha demostrado que la activación de MCP-1 e IL-6 en CMLVs, es dependiente de la activación de la NAD(P)H oxidasa (Mehta y Griendling, 2007). Otra de las acciones locales más importantes mediadas por la Ang II es el aumento en la producción de diferentes factores de crecimiento como PDGF, VEGF, TGF- β o CCN2, así como la síntesis de proteínas de la MEC (Rupérez et al., 2003; Mehta y Griendling, 2007; Iwanciw et al., 2003; Kagami et al., 1994; Ponticos, 2013).

A través de todos estos mecanismos y factores, la Ang II desencadena la activación de diferentes procesos, como la producción de ROS, la inflamación, la activación plaquetaria, la alteración en la reactividad del vaso, el crecimiento y la migración celular o la fibrosis; los cuales conducen al desarrollo de diferentes patologías cardiovasculares como la hipertensión, la aterosclerosis, la restenosis o el fallo cardíaco (Mehta y Griendling, 2007). Debido a las múltiples respuestas reguladas por Ang II, los fármacos que bloquean sus efectos, iECAs y ARAII, presentan efectos órgano-protectores más allá del control de la presión sanguínea.

4.2. Factor de crecimiento transformante- β

La superfamilia del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), está formada por un grupo de factores de crecimiento relacionados estructuralmente, entre los que se encuentran las tres isoformas de TGF- β (TGF- β 1/2 y 3), activinas, inhibinas y las proteínas de la morfogénesis del hueso (BMPs) (Zhao y Chen, 2014), que participan en la división, diferenciación, migración, adhesión, organización y muerte celular (Javelaud y Mauviel, 2004; Massague et al., 2005; Moustakas et al., 2002). Dentro de esta familia, se ha determinado que el TGF- β tiene un papel muy importante en la homeostasis celular, ya que la inhibición de su ruta se ha correlacionado con muchas enfermedades humanas, como cáncer, enfermedades autoinmunes, fibróticas y cardiovasculares (Zhao y Chen, 2014) siendo la isoforma TGF- β 1 la que tiene un papel más relevante en el sistema cardiovascular (Annes et al., 2003). La síntesis de este factor conlleva varios pasos, ya que se sintetiza como una proteína inactiva (TGF- β latente), unida a un péptido de latencia (LAP) que interacciona con diferentes proteínas de unión a TGF- β y hace que quede anclado a la MEC. Posteriormente, mediante un corte proteolítico regulado por diversos factores, como la trombospondina 1 (TSP-1), la plasmina, microambientes ácidos, las metaloproteinasas o la Integrina- β 6, queda libre y activado (Leask, 2009; Annes et al, 2003; Gibbons et al., 1992; Leask y Abraham, 2004).

La señalización por TGF- β comienza con la unión de TGF- β con sus receptores treonina-serina quinasa, T β RI y T β RII, en la membrana celular (Zhao y Chen, 2014). La unión del ligando desencadena la formación de un heterocomplejo entre los dos receptores en el cual T β RII fosforila y activa la capacidad serina-treonina quinasa de T β RI. Una vez activo, T β RI recluta y fosforila las proteínas de la familia Smad (R-Smad: Smad2 y Smad3), las cuales forman un heterocomplejo con otro miembro de la familia Smad (Co-Smad: Smad4). Finalmente, este complejo se transloca al núcleo y regula la transcripción de sus genes diana mediante la interacción con otros factores de transcripción (Leask, 2009; Zhao y Chen, 2014). Se ha descrito que durante el desarrollo del daño vascular los niveles, tanto de TGF- β como de sus receptores, así como su actividad, aumentan dentro de la pared vascular (Wang et al., 2005). Además de esta señalización “clásica” a través de la ruta Smad, se ha descrito que TGF- β también puede activar otra serie de vías, como diferentes MAPKs, incluidas ERK, p38 y JNK, la ruta del PI3K/AKT o GTPasas pequeñas (Moustakas y Heldin, 2005; Zhao y Chen, 2014).

El TGF- β está directamente relacionado con el desarrollo de la fibrosis vascular, ya que induce la proliferación y transformación de los fibroblastos residentes en miofibroblastos, los cuales comienzan a sintetizar MEC y contribuye a la aceleración del proceso fibrótico (Cichon y Radisky, 2014). Sin embargo, también se ha descrito TGF- β como un mediador antiinflamatorio (Li MO et al., 2006), ya que los ratones que sobreexpresan TGF- β , o alguno de los componentes de su vía de señalización, presentan una mayor protección frente a la inflamación en diversos modelos experimentales inflamatorios (Chen et al., 1998; Piccirillo et al., 1998; Jin et al., 2000; Giladi et al., 1995). En el caso particular de la aterosclerosis, actualmente se maneja la hipótesis de que TGF- β actúa como una citoquina protectora, ya que contribuye al mantenimiento de la estructura normal del vaso y al control del balance entre inflamación y acumulación de proteínas de la MEC (Singh y Ramji, 2006). Sin embargo, en células vasculares, está descrito que TGF- β es uno de los factores profibróticos más potentes, debido a que incrementa la producción de colágenos y de otras proteínas de la MEC (Ruiz-Ortega et al., 2007).

Esta controversia en cuanto a los efectos beneficiosos y perjudiciales regulados por TGF- β , hace que este factor no pueda ser utilizado como diana terapéutica en humanos, siendo necesario profundizar en los mecanismos implicados en su regulación y las rutas celulares que activa, con el fin de diseñar nuevas dianas terapéuticas que puedan ser abordadas en pacientes.

4.3. Factor de crecimiento de tejido conectivo

4.3.1. Definición y estructura del factor de crecimiento de tejido conectivo

El factor de crecimiento de tejido conectivo (CCN2/CTGF) es una proteína secretable, matricelular y rica en cisteínas, que fue identificada por primera vez en medio condicionado de células de vena de cordón umbilical humano, y que puede ejercer varias funciones biológicas dependiendo del contexto celular (de Winter et al., 2008; Hall-Glenn y Lyons, 2011). CCN2 se expresa abundantemente durante la embriogénesis, con mayor presencia durante el desarrollo del corazón, los arcos branquiales y tejidos neuronales, así como en el endotelio y las capas de músculo liso de la mayoría de los vasos sanguíneos, por lo que, durante el desarrollo, este factor

juega un papel muy importante en el remodelado de la MEC y en la formación de múltiples compartimentos de tejido conectivo (Ponticos, 2013).

CCN2 forma parte de la familia de genes de respuesta temprana CCN, compuesta por otros cinco miembros más: CCN1/Cyr61 (proteína rica en cisteína 61), CCN3/Nov (gen sobreexpresado en nefroblastoma), y tres proteínas secretadas inducidas por Wnt-1, CCN4/WISP-1, CCN5/WISP-2 y CCN6/WISP-3 (Perbal, 2001; Leask y Abraham, 2006; Hall-Glenn y Lyons, 2011). CCN2 es una proteína monomérica de 36-38 kDa, constituida por 349 residuos, con una arquitectura modular que comprende un péptido señal de secreción N- terminal (SP) y 4 módulos funcionales: I) dominio de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGF); II) dominio del factor Von Willebrand tipo C (VWC), que participa en la oligomerización y formación de las proteínas; 3) dominio trombospondina-1, implicado en la unión de macromoléculas solubles y de matriz; y 4) dominio C-terminal (CT), implicado en la unión a la superficie celular, posee actividad mitogénica para fibroblastos y es el responsable de la interacción con fibronectina (Sánchez-López et al., 2009b; Perbal, 2001; Leask y Abraham, 2006; Rachfal y Brigstock, 2005; Abreu et al., 2002; Hall-Glenn y Lyons, 2011) (Figura 6).

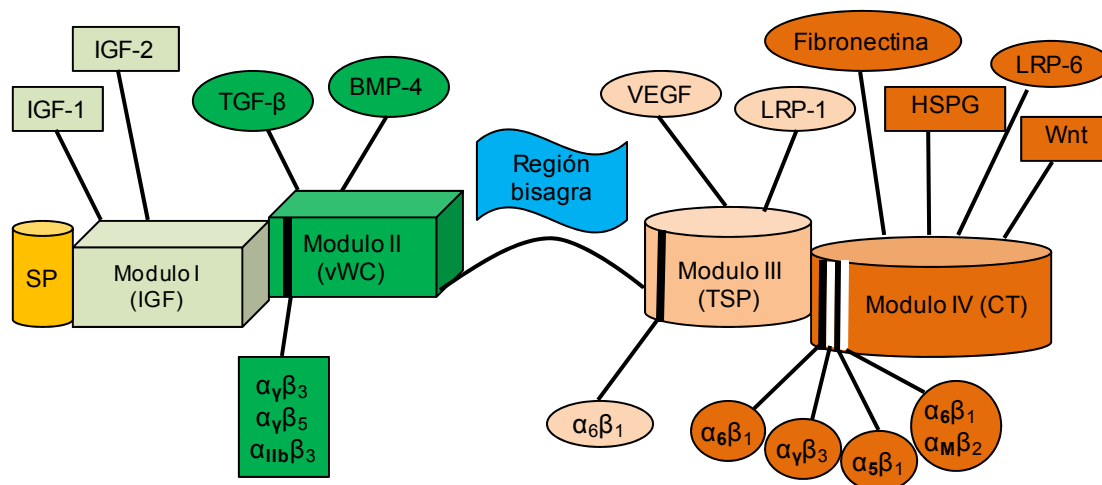


Figura 6. Esquema de la estructura y los sitios de unión del CCN2.

Entre los módulos II y III se encuentra una región “bisagra”, la cual es susceptible de ser degradada por varias proteasas, incluidas las MMPs, 1,2,3,7,9 y 13, la elastasa y la plasmina, siendo estas 2 últimas capaces de separar los módulos de manera individual y dar lugar a 4 fragmentos (Hashimoto et al., 2003). En los fluidos biológicos, el CCN2 puede encontrarse en varias formas: la molécula entera, fragmentos como las dos mitades N- y C-terminales cortadas por la región bisagra, y también fragmentos individuales de 10-12 kDa que se corresponden con el módulo IV, también denominado CCN2(IV) (Leask y Abraham, 2006; de Winter et al., 2008; Brigstock et al., 1997). Estas variaciones producen una subfamilia de proteínas secretadas con diferentes funciones. Sin embargo, los efectos biológicos *in vivo* de CCN2 y de sus fragmentos están todavía poco esclarecidos.

4.3.2. Expresión y funciones del CCN2

Existen numerosos factores y moléculas que, dependiendo del tipo celular en el que se encuentren, regulan la expresión de CCN2. Los agonistas de receptores acoplados a proteínas G, como TGF- β , Ang II, BMPs, VEGF, IGF, GM-CSF, IL-4, las altas concentraciones de glucosa, la hipoxia, el estrés mecánico o el estrés oxidativo, pueden desencadenar un rápido aumento en la expresión de CCN2 en diferentes tipos celulares, como células endoteliales, de músculo liso, mesangiales, epiteliales, condrocitos o trofoblastos (Babic et al., 1999; Chen et al., 2003; Hoshijima et al., 2006; Liu et al., 2008; Murphy et al., 1999; Park et al., 2001; Rimon et al., 2008; Zhou et al., 2004). Por otro lado, existen otros factores como IL-1 β , TNF- α , el AMPc o el tratamiento con agonistas del PPAR- γ , que inhiben la expresión de CCN2 inducida por TGF- β y Ang II en algunos tipos celulares, como células de músculo liso o fibroblastos (Abraham et al., 2000; Duncan et al., 1999; Fu et al., 2001; Wang et al., 2007; Sánchez-López et al., 2008). Se han descrito diferentes rutas a través de las cuales estos factores pueden modular la expresión de CCN2, como la vía de señalización Smad, los ROS, la activación de RhoA, PKC, JAK, PI3K o de la cascada de MAPKs (Chen et al., 2002; Iwanciw et al., 2003; Lee et al., 2004; Wahab et al., 2005).

A nivel celular, CCN2 se ha descrito tradicionalmente como un mediador de los procesos fibróticos activados por otros factores, como Ang II o TGF- β . Sin embargo, recientemente se ha demostrado que CCN2 es capaz de regular directamente otras respuestas celulares de tipo inflamatorio, como la activación del NF- κ B o la inducción de la respuesta Th17 en riñón (Sánchez-López et al., 2009a; Rodrigues Diez et al., 2013). Existen también varios trabajos en los que se ha descrito el CCN2 como un factor quimioatrayente para células inmunes (Cicha et al., 2005). Estos datos parecen indicar que CCN2 por un lado, promueve la migración y la adhesión de células inmunes circulantes, y por otro lado sobrerregula la producción de factores proinflamatorios, incluidas citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión celular (Perbal, 2004; de Winter et al., 2008; Kular et al., 2011; Chen y Lau, 2009; Cicha et al., 2005).

4.3.3. Sitios de unión del CCN2

Aunque se han realizado muchos esfuerzos por encontrar un receptor específico del CCN2, actualmente no se ha encontrado ninguno. Se han descrito algunos complejos receptor-CCN2 en condrocitos (Nishida et al., 1998) y además, se ha observado que CCN2 puede interactuar con diferentes moléculas, como integrinas, proteoglicanos heparan sulfato, BMP-4, TGF- β , VEGF, IGF, trombospondina o fibronectina, para modular diferentes las respuestas celulares (Inoki et al., 2001; Leask y Abraham, 2006; Babic et al., 1999; Moussad y Brigstock, 2000; Abreu et al., 2002; Hall-Glenn y Lyons, 2011; Kim et al., 1997; Hoshijima et al., 2006).

Estudios más recientes, han demostrado que, tanto la proteína CCN2 completa, como el módulo IV (CCN2(IV)), son capaces de unirse directamente y activar al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), regulando con ello diferentes respuestas celulares (Rayego et al., 2013; Chang et al., 2013). Se ha descrito que EGFR regula la angiogénesis, el crecimiento, la migración celular (Schreier et al., 2014) y que, además, está involucrado en la patogénesis de diferentes enfermedades como la aterosclerosis, la hipertensión y la diabetes tipo 2 (Dreux et al.,

2006; Kagiya et al., 2002; Matrougui, 2010). Este receptor puede ser activado bien por la unión directa de un ligando específico como el EGF o bien mediante una transactivación inducida por estímulos extracelulares tales como, citoquinas, integrinas o agonistas de receptores acoplados a proteínas G, como la Ang II (Schreier et al., 2014; Moriguchi et al., 1999). En este último caso, se ha demostrado que la transactivación de EGFR inducida por Ang II, conduce a la aparición de estrés oxidativo, a la inducción de un fenotipo proinflamatorio celular (Seshiah et al., 2002) y a un aumento en la expresión a nivel génico de fibronectina y TGF- β (Matsubara et al., 2000).

4.4. CCN2 en patología vascular

Durante el desarrollo embrionario, CCN2 se encuentra abundantemente expresado en el sistema cardiovascular, principalmente en los grandes vasos sanguíneos, mientras que en los tejidos adultos normales se encuentra prácticamente ausente (Ivkovic et al., 2003). Sin embargo, existen estudios donde se ha detectado una sobreexpresión de CCN2 en diferentes modelos experimentales animales y en diversas patologías humanas tales como enfermedades cardíacas, remodelado vascular, hipertensión pulmonar o la enfermedad renal crónica. (Perbal, 2004; de Winter, 2008; Phanish et al., 2010; Riser et al., 2003; Cicha et al., 2005), lo que sugiere que este factor puede tener un papel importante en las patologías cardiovasculares. En un modelo de angioplastia de carótida y sobreexpresión de Smad 3 en ratón, se ha demostrado que CCN2 controla las interacciones de las CMLVs con los fibroblastos de la capa adventicia del vaso, proceso que da lugar a un remodelado adaptativo de las CMLVs (Kundi et al., 2009). Además, se han detectado niveles elevados de CCN2 en aneurismas (Branchetti et al., 2013) y en disfunción cardíaca (Koitabashi et al., 2008). Por otro lado, se ha observado que la sobreexpresión de CCN2 en modelos experimentales de daño cardíaco en ratón, como infarto o hipertrofia miocárdica, presenta efectos beneficiosos (Gravning et al., 2012; Gravning et al., 2013). Todos estos estudios muestran la presencia de CCN2 en numerosas enfermedades cardiovasculares; sin embargo, los mecanismos moleculares precisos, las interacciones y las rutas de señalización utilizadas por CCN2 en estas patologías no están todavía bien esclarecidos. Numerosos estudios han resaltado la importancia que tiene la regulación de los niveles de CCN2 en la patogénesis de muchas enfermedades en las que aparece fibrosis, como enfermedades autoinmunes, cirrosis hepática, nefropatía diabética, hipertensión pulmonar, ECVs y cáncer (Ponticos, 2013). En esta línea, se han publicado varios estudios independientes donde se han evaluado los niveles de CCN2 en orina y/o suero de pacientes con diferentes enfermedades renales crónicas, detectando diferencias en los niveles de la molécula CCN2 completa (O'Seaghdha et al., 2011, Nguyen et al., 2006), o de su fragmento N-terminal (Nguyen et al., 2006, Slagman et al., 2011) o del fragmento C-terminal (Riser et al., 2003, Bao et al., 2008). Estos estudios, han servido para que CCN2 sea propuesto como un biomarcador de riesgo en la nefropatía diabética humana y otras patologías renales crónicas (Riser et al., 2003; Tam et al., 2009; Phanish et al., 2010; Slagman et al., 2011), y como un marcador de disfunción cardíaca en pacientes con fibrosis miocárdica y fallo cardíaco crónico (Koitabashi et al., 2008).

Objetivos

OBJETIVOS

Objetivo general

A pesar de los numerosos estudios que sugieren que CCN2 juega un papel importante en el desarrollo y la patogenia de las ECVs, todavía no se conocen bien las acciones directas que ejercen esta proteína, o sus fragmentos, sobre la pared vascular. La evaluación de los efectos directos que pueden generar este factor o sus fragmentos sobre algunos de los mecanismos intracelulares que se llevan a cabo en la pared vascular, como los procesos redox o la respuesta inflamatoria, pueden ser de gran interés para determinar con mayor precisión su papel en las patologías cardiovasculares. Por todo esto, el objetivo del presente trabajo será evaluar si CCN2(IV) puede regular procesos redox e inflamatorios a nivel vascular, determinando los mecanismos y receptores implicados.

Objetivos concretos

1. Evaluar si en situaciones de daño vascular existe una asociación entre los niveles de CCN2 y la producción de ROS. Para ello se realizará un modelo experimental de daño vascular inducido por Ang II.
2. Evaluar si CCN2(IV) regula procesos redox a nivel vascular. Se determinará si CCN2(IV) induce directamente la producción de $O_2^{\cdot -}$ y regula la actividad NAD(P)H oxidasa a nivel vascular, en CMLVs y CEs en cultivo, y en aorta *ex vivo* e *in vivo*.
3. Estudiar los efectos de CCN2(IV) sobre la función vascular aórtica.
4. Evaluar el papel directo de CCN2(IV) sobre dos de los procesos más importantes en el daño vascular: la inflamación y la fibrosis.
5. Investigar los mecanismos moleculares asociados a las respuestas inducidas por CCN2(IV) a nivel vascular.
6. Determinar si las respuestas inducidas por CCN2(IV) pueden estar mediadas por el receptor EGFR.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelos experimentales.

Los estudios en animales fueron realizados acorde a la normativa nacional vigente (BOE Núm. 268 Ley 32/2007 y BOE Núm. 34 Real Decreto 53/2013) y aprobados por el comité ético de la institución en la que se realizaron (Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz y Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid). Los modelos se realizaron en ratones machos de la cepa C57BL/6 de entre 8-10 semanas de edad (Charles River) y con un peso de entre 20-25 g. A su recepción, los animales fueron aislados durante un periodo de cuarentena y el mantenimiento posterior se llevó a cabo en jaulas ventiladas para disminuir la exposición a agentes patógenos.

El día de la eutanasia, los animales fueron anestesiados con una mezcla de Xilacina (Rompun; 5 mg/kg) y Ketamina (Ketolar; 35 mg/kg) y posteriormente se les aplicó una dislocación cervical. Inmediatamente después, los animales fueron exanguinados mediante la perfusión de suero salino frío a través del ventrículo izquierdo. En último término se extrajeron las aortas y se dividieron en varias secciones para realizar diferentes estudios. Una sección se fijó en paraformaldehído (PFA) 4% y posteriormente se incluyó en parafina para realizar estudios inmunohistoquímicos. Otra sección se incluyó en medio de crioconservación OCT (Sakura), para realizar estudios de fluorescencia. El resto de la aorta se congeló en nitrógeno líquido para evaluar diferentes genes y proteínas. En estudios realizados en grupos adicionales, se separaron secciones aórticas para: estudiar la reactividad vascular de la aorta *ex vivo*, medir la actividad NAD(P)H oxidasa y evaluar la producción de $O_2^{\cdot-}$ y de NO.

1.1. Modelo experimental de infusión de Angiotensina II en ratón.

La infusión de Ang II (1000 ng/kg/min; 7 días; Tocris) se llevó a cabo mediante la implantación subcutánea de minibombas osmóticas (modelo 2002; ALZET) en los ratones, que liberan Ang II a velocidad y concentración constante (0,5 μ l/h). Para ello se anestesiaron los ratones utilizando un vaporizador de Isoflurano (FORANE, AbbVie Farmacéutica), se les realizó una pequeña incisión en la parte dorsal para implantar las minibombas cargadas con Ang II y finalmente se les suturó la herida. Se utilizaron 10 ratones por grupo, empleando un grupo de 10 ratones infundidos con suero salino (vehículo de la Ang II) como grupo control (Figura 7).

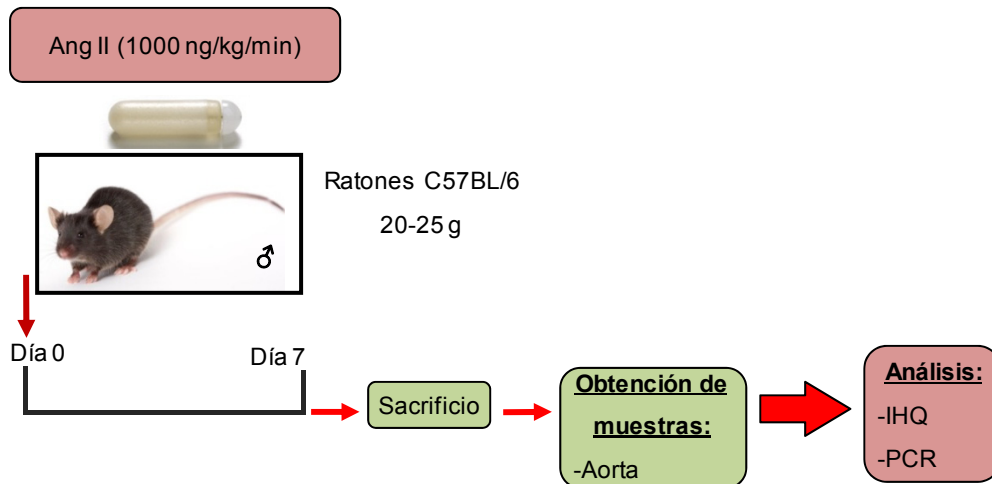


Figura 7. Modelo de infusión de Ang II en ratón durante 7 días utilizando minibombas osmóticas.

1.2. Modelo experimental de administración sistémica del fragmento C-terminal del factor de crecimiento de tejido conectivo (CCN2(IV)) en ratón.

Para determinar los efectos del fragmento C-terminal del factor de crecimiento de tejido conectivo (denominado en este trabajo como CCN2(IV)) *in vivo*, un grupo de ratones fue tratado durante 24 h con una única dosis (2,5 ng/g de peso) de CCN2(IV) recombinante (PeproTech) disuelto en suero salino y administrado por vía intraperitoneal (i.p.). La dosis de CCN2(IV) utilizada para el tratamiento de los ratones se calculó teniendo en cuenta tanto estudios previos realizados en ratones (Sánchez-Lopez et al., 2009a; Rayego-Mateos et al., 2013) como los niveles de CCN2 circulante detectados en diferentes patologías humanas (Gressner et al., 2013; Bergestuen et al., 2010). Paralelamente, un grupo de ratones fue inyectado con suero salino por vía i.p. para ser utilizado como grupo control. Para estudiar diferentes mecanismos que pudieran estar implicados en los efectos del CCN2(IV) en la aorta, se realizaron grupos experimentales adicionales a los que se les administraron diferentes fármacos de manera conjunta con el CCN2(IV). (Figura 8). Todos los grupos realizados contaron inicialmente con 10 ratones y, en primer lugar, se comprobó la inocuidad del solvente en el que fueron administrados con el fin de determinar que los efectos que se obtuvieran estaban producidos únicamente por el fármaco administrado. Una vez se comprobó esta premisa, se procedió a utilizar el grupo tratado con suero salino como grupo control de todos los tratamientos administrados.

1.2.1. Inhibición de la activación del Factor Nuclear kappa B.

Con el propósito de estudiar el papel que juega la ruta del NF-κB en la respuesta producida por CCN2(IV) en la aorta, se realizó un estudio con un inhibidor farmacológico de la activación del NF-κB (Parthenolide; 3,5 mg/kg de peso y disuelto en DMSO; Sigma), inyectando a los ratones una dosis por vía i.p. 24 h antes de la administración del CCN2(IV) y otra dosis a día 0. (Figura 8).

1.2.2. Uso de antioxidantes e inhibición de la enzima NAD(P)H oxidasa 1 (Nox1).

Para evaluar el posible papel de las respuestas redox en los efectos del CCN2(IV) en la aorta, se diseñaron dos grupos diferentes. Un grupo fue tratado con un compuesto antioxidante (Apocinina; 50 mg/kg de peso, disuelta en suero salino; Sigma), recibiendo una inyección por vía i.p. 24 h antes de la administración del CCN2(IV) y otra dosis a día 0. El segundo grupo fue tratado con un *in vivo* Oligo-Morfolino frente a Nox1 (5'-ACCAGCCAGTTTCCCATTGTCAAAT-3'; 10 mg/kg de peso; GeneTools), para inhibir la expresión de Nox1, recibiendo una dosis por vía retro-orbital (Yardeni et al., 2011) 24 h antes de la administración del CCN2(IV) y otra dosis a día 0. (Figura 8).

1.2.3. Inhibición del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR).

Para determinar la implicación del EGFR en los efectos del CCN2(IV), un grupo de ratones fue tratado con un inhibidor de la quinasa del EGFR (Erlotinib; 40 mg/kg; disuelto en suero salino al 10% de etanol; Vichem), recibiendo una dosis por vía i.p. 24 h antes de la administración del CCN2(IV) y otra dosis a día 0. (Figura 8).

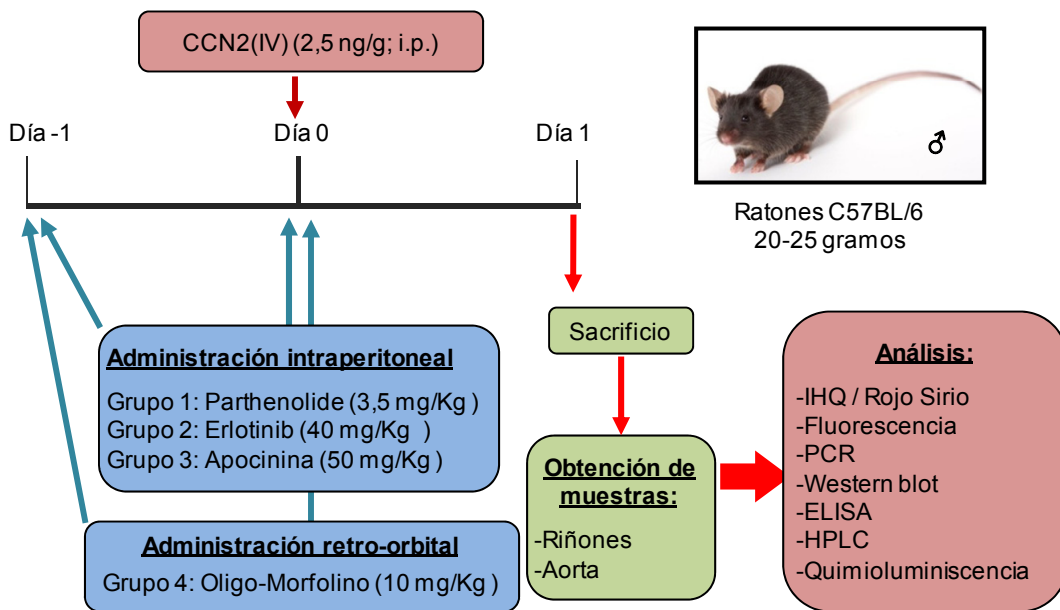


Figura 8. Modelo experimental de administración sistémica de CCN2(IV) en ratón durante 24 h con diferentes tratamientos adicionales.

2. Estudios *in vitro*.

2.1. Obtención de los diferentes tipos celulares.

Las células de músculo liso vascular (CMLVs) de ratón se obtuvieron a partir de aortas torácicas de ratones hembras de la cepa C57BL/6. Para ello, se anestesiaron 4 ratones con una mezcla de Xilacina (Rompun; 5 mg/kg) y Ketamina (Ketolar; 35 mg/kg), y seguidamente se les practicó la eutanasia por dislocación cervical. Las aortas se extrajeron y se depositaron en un frasco con suero salino frío y estéril para realizar el resto del proceso en una campana de cultivo en condiciones de esterilidad. En primer lugar, se retiraron los restos de grasa de las aortas y se

cortaron en trozos pequeños de manera transversal. Los trozos fueron incubados en 2 ml de medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), suplementado con Glutamina (1% de L-Glutamina a 200mM) y Penicilina/Estreptomicina (100 U/ml de cada una) y mezclado con 500 U/ml de colagenasa tipo II (Sigma) durante 20 min a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 2 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con Glutamina, Penicilina/Estreptomicina y con suero fetal bovino (SFB) al 20% para detener la actividad enzimática de la colagenasa II. Se recogieron los 4 ml de medio junto con los restos de aorta, se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y el *pellet*, con los restos de aorta, se resuspendió de nuevo en medio DMEM al 20% de SFB. Este último paso se realizó tres veces más y finalmente el *pellet* se resuspendió en DMEM al 20% de SFB y se sembró en un frasco de cultivo T-25. En los 4 primeros pases las células se cultivaron en DMEM al 20% de SFB mientras que, a partir del quinto pase, los cultivos se realizaron en DMEM al 10% de SFB. La caracterización de las CMLVs se realizó por observación constante de su morfología en el microscopio así como por inmunotinciones para determinar la positividad de las células a la α -actina de músculo liso (α -SMA; Sigma).

Para realizar estudios en células endoteliales de ratón (CEs), se utilizó una línea comercial de células endoteliales de páncreas de ratón (MILE SVEN 1; ATCC: CRL-2279) y se siguieron las indicaciones de la casa comercial para su cultivo. En ambos casos los reactivos utilizados para el crecimiento y el mantenimiento celular fueron obtenidos de Lonza, mientras que el material desechable utilizado para el cultivo se adquirió en Cultek.

2.2. Experimentos en células en cultivo.

Todos los experimentos *in vitro* se realizaron con células al 80% de confluencia y privadas de SFB durante 24 h. En los experimentos en los que existía algún tratamiento farmacológico adicional al tratamiento con CCN2(IV), las células fueron incubadas con el fármaco durante los 60 min previos a la adición de CCN2(IV) (Tabla 1).

Para los tratamientos donde se realizaron silenciamientos génicos con ARN de interferencia (ARNi), las células fueron transfectadas en medio Opti-MEM (Gibco) con el ARNi correspondiente durante 24 h, utilizando para ello el reactivo Lipofectamina RNAi-MAX (50 nM; Invitrogen). Posteriormente se crecieron en condiciones normales con DMEM al 10% de SFB durante 24 h y fueron mantenidas en medio privado de SFB durante las 24 h previas a la adición de CCN2(IV). Como control de la técnica se utilizó un ARNi control, mientras que la efectividad del silenciamiento del gen diana fue confirmada mediante PCR. En los experimentos de inmunofluorescencia y detección *in situ* de O_2^- por DHE, las células se crecieron en cubreobjetos de cristal colocados dentro de placas de cultivo de 24 pocillos. Los tratamientos y dosis utilizados en los diferentes experimentos se detallan en la Tabla 1.

	Dosis utilizada	Descripción	Casa comercial
CCN2(IV)	10/50/100 ng/ml	Fragmento C-terminal del CCN2	PreProtech
Parthenolide	1 μ M	Inhibidor de NF- κ B	Sigma
BAY 11-7082	1 μ M	Inhibidor de NF- κ B	Sigma
Apocinina	0,3 mM	Antioxidante	Sigma
ML-171	1 μ M	Inhibidor específico de Nox1	Sigma
RNAi de p22phox	5 ng/ml	Silenciador de p22phox	Ambion
RNAi de Nox1	5 ng/ml	Silenciador de Nox1	Ambion
RNAi Control	5 ng/ml	Silenciador Control	Ambion

Tabla 1. Tratamientos y dosis utilizados para los experimentos *in vitro*.

3. Estudios *ex vivo*.

3.1. Análisis de la unión de CCN2(IV) a la aorta por microscopía confocal.

Para comprobar si el CCN2(IV) era capaz de unirse directamente a las CMLVs en la aorta, realizamos un experimento con segmentos de aorta de ratón *ex vivo* en el que marcamos el CCN2(IV) con una sonda fluorescente (Cy5; 1 nmol/ml; Amersham) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Los segmentos aórticos se incubaron durante diferentes tiempos con CCN2(IV)-Cy5 (100 ng/ml), posteriormente se mantuvieron en una solución de Krebs Henseleit-HEPES (KHS-HEPES, en mM: 115 NaCl, 25 HEPES, 4,7 KCl; 1,2 MgSO₄; 7 H₂O; 2,5 CaCl₂; 1,2 KH₂PO₄; 11,1 glucosa y 0,01 Na₂EDTA) al 30% de sacarosa durante 20 min y finalmente se conservaron en OCT a -80 °C. Utilizando un criostato, se realizaron cortes de 4 μ m de las muestras incluidas en OCT, se colocaron en portaobjetos con carga positiva (Dako), se incubaron con DAPI (Sigma) durante 5 min para contrastar los núcleos, se lavaron con PBS y finalmente se montaron con Mowiol 40-88 (Sigma). El estudio de las muestras se realizó en un microscopio confocal de fluorescencia (Leica) utilizando un filtro de excitación/emisión de 630/670 nm, para detectar la emisión del Cy5, y un laser de Diodo a 405 nm para detectar la emisión del DAPI.

3.2. Estudios en aorta de ratón *ex vivo*.

Los estudios en aorta de ratón *ex vivo* se realizaron utilizando segmentos de aortas extraídas de ratones sanos de la cepa C57BL/6 y con un peso de entre 20-25 g. Los segmentos fueron incubados con CCN2(IV) (50 ng/ml; 60 min) en ausencia o presencia de Apocinina (0,3 mM) o ML-171 (1 μ M), los cuales fueron añadidos 60 min antes de la adición de CCN2(IV). Después de los tratamientos, estos segmentos fueron sometidos a diferentes estudios de medida de la reactividad vascular, producción de $O_2^{\cdot-}$ y evaluación de la actividad NAD(P)H oxidasa.

4. Estudios de actividad enzimática NAD(P)H oxidasa, de producción de radicales libres de oxígeno y de NO.

4.1. Determinación de la actividad NAD(P)H oxidasa en aorta y en CMLVs en cultivo.

Para determinar la actividad NAD(P)H oxidasa en el tejido aórtico y en CMLVs *in vitro*, se utilizó un kit de quimioluminiscencia por lucigenina (Sigma), el cual se basa en la capacidad de este compuesto para oxidarse ante la presencia de ROS y emitir una señal quimio-luminiscente que puede ser cuantificada. Para los estudios *ex vivo*, se extrajeron segmentos aórticos de ratón y se incubaron en una solución de Krebs Henseleit (KHS, en mM: 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 4,7 KCl; 1,2 MgSO₄; 7 H₂O; 2,5 CaCl₂; 1,2 KH₂PO₄; 11,1 glucosa y 0,01 Na₂EDTA) con CCN2(IV) solo (50 ng/ml, 60 min, 37 °C), o junto con un inhibidor selectivo de Nox1 (ML-171; 1 μ M), el cual fue añadido 60 min antes del tratamiento con CCN2(IV). Para los estudios *in vitro* se utilizaron placas de cultivo de 60 mm de diámetro con CMLVs crecidas en medio sin FBS y tratadas con CCN2(IV) (50 ng/ml) durante 60 min.

Tanto los segmentos aórticos como las CMLVs fueron homogeneizados y lisados en un tampón adecuado para la técnica (KH₂PO₄ 50 mM, EGTA 1 mM, sacarosa 150 mM; pH 7.4). Las muestras fueron transferidas a una placa blanca de 96 pocillos en la que se realizó una primera medida basal utilizando un luminómetro de placas (AutoLumat LB 953; Berthold) la cual sirvió como blanco del estudio. Posteriormente se añadió a cada muestra una solución con NAD(P)H (0,1 mM), que sirvió como sustrato de la reacción, con lucigenina (5 μ M) y con el buffer fosfato correspondiente, y se realizó una segunda medida. La actividad NAD(P)H oxidasa fue determinada mediante los cambios en la luminiscencia registrados durante 200 segundos en el luminómetro a intervalos de 5 segundos. Las medidas obtenidas se corrigieron frente a sus correspondientes valores basales y se normalizaron utilizando la concentración total de proteínas de cada muestra, determinada por el método del ácido bicinconínico (BCA, Pierce).

4.2. Medida de la producción de $O_2^{\cdot-}$ en células en cultivo por quimioluminiscencia con la sonda L-012.

Las células, tanto CEs como CMLVs, fueron cultivadas en placas blancas de 96 pocillos y mantenidas en medio OPTI-MEM (Gibco) 24 h. Posteriormente, se trataron con CCN2(IV) (50 ng/ml) durante 60 min para estudiar la producción de anión superóxido. Al final de cada

tratamiento con CCN2(IV) las células fueron incubadas con la sonda L-012 (400 μ M; Wako) durante 15 min, la cual en presencia de ROS, principalmente $O_2^{\cdot-}$, se oxida y da lugar a un producto luminiscente que puede ser cuantificado. Una vez transcurrido este tiempo, se midió la luminiscencia de cada pocillo en un luminómetro de placas. Para determinar la especificidad del L-012 por el anión superóxido se utilizó un pocillo de la placa de 96 al que se añadió el secuestrador de $O_2^{\cdot-}$ SOD (150 U/ml). La concentración de la proteína se determinó mediante el método del BCA y fue utilizada para normalizar la luminiscencia obtenida en cada muestra.

4.3.Detección *in situ* de la producción de $O_2^{\cdot-}$ en aorta y en células en cultivo por microscopía confocal.

Para evaluar la producción *in situ* de $O_2^{\cdot-}$ en aorta, se utilizó la sonda oxidativa fluorescente dihidroethidio (DHE; Invitrogen). El DHE es un compuesto que penetra en las células y al ser oxidado por el anión superóxido emite una señal fluorescente en rojo. Dependiendo de la muestra a estudiar, se realizaron diferentes preparaciones. Para los experimentos *ex vivo* se equilibraron los segmentos aórticos en KHS-HEPES durante 30 min y posteriormente se realizaron los diferentes tratamientos. Los segmentos fueron tratados con CCN2(IV) solo (50 ng/ml, 60 min, 37°C), o junto con un inhibidor específico de Nox1 (ML-171; 1 μ M) que fue añadido 1 hora antes del tratamiento con CCN2(IV). Una vez terminado el tratamiento, los segmentos de aorta fueron incluidos en OCT y crioconservados a -80 °C. A continuación, se realizaron cortes de 4 μ m de las muestras en OCT en un criostato y se recogieron en portaobjetos con carga positiva (Dako). Los cortes fueron equilibrados con KHS-HEPES (30 min, 37 °C) e incubados con KHS-HEPES fresco con DHE (5 μ M, 30 min, 37 °C). Finalmente los cortes se lavaron y se montaron con el reactivo Prolong Gold (Invitrogen) para ser estudiados.

Para los estudios *in vitro*, se utilizaron CMLVs y CEs crecidas sobre cubreobjetos de cristal colocados en placas de cultivo de 24 pocillos. Antes de comenzar el estudio, las células se mantuvieron durante 24 h en medio sin FBS y posteriormente se incubaron con CCN2(IV) a diferentes tiempos y dosis. Una vez transcurrido el tiempo del estudio, se equilibraron las células en KHS-HEPES (30 min, 37 °C), y se incubaron con KHS-HEPES fresco con DHE (5 μ M, 30 min, 37 °C). Por último, las células se fijaron en PFA 4 % durante 20 min, se lavaron con PBS y se montaron con Prolong Gold para ser analizadas.

En ambos casos, la fluorescencia fue detectada utilizando un microscopio confocal de fluorescencia con un filtro de Excitación/Emisión de 540/610 nm. Como control negativo de la técnica, se preincubó una muestra en cada caso con el secuestrador del anión superóxido Tiron (100 μ M). El análisis cuantitativo de la producción de anión superóxido se realizó mediante el cálculo de la densidad óptica integrada en cuatro áreas por muestra de cada condición experimental, utilizando para ello el programa de análisis de imagen MetaMorph (Molecular Devices).

4.4. Medida de la producción de $O_2^{\cdot -}$ en aorta y en células en cultivo por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Este estudio se realizó en secciones de aorta de ratones tratados *in vivo*, en secciones de aorta tratadas *ex vivo*, y en células en cultivo. Una vez finalizaron los tratamientos, el procesamiento de las aortas fue similar en ambos casos. Tanto las secciones de las aortas extraídas tras la eutanasia de los modelos, como los segmentos aórticos tratados *ex vivo*, fueron incubados durante 30 min en KHS-HEPES fresco con DHE (5 μ M, 30 min, 37 °C) y congelados en nitrógeno líquido para ser procesados. Posteriormente, las muestras criopreservadas en nitrógeno líquido fueron pulverizadas utilizando un troquel y homogeneizadas en acetonitrilo (300 μ l). Las células en cultivo, una vez finalizado cada tratamiento, se equilibraron en KHS-HEPES (30 min, 37°C), se incubaron en KHS-HEPES con DHE (5 μ M, 30 min, 37 °C), se levantaron y se homogenizaron en acetonitrilo (300 μ l).

Ambas muestras, aortas y células en cultivo, homogeneizadas en acetonitrilo, fueron tratadas del mismo modo a partir de este punto. El homogeneizado fue sonificado, centrifugado (12000 rpm; 15 min a 4°C) y el sobrenadante resultante recolectado. Seguidamente, se secó el sobrenadante en una bomba de vacío y el *pellet* obtenido se resuspendió en 25 μ l de KHS-DTPA (100 μ M). Para eliminar impurezas, las muestras se filtraron y se utilizaron 5 μ l de cada una para determinar la concentración de proteínas por el método del BCA. Por último, 4 μ g de cada muestra se analizaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC; Agilent Technologies), utilizando una columna de fase inversa C-18 (Kinetex), un gradiente de soluciones A (acetonitrilo puro) y B (H_2O /acetonitrilo 10 %/ácido trifluoroacético 0,1 %; v/v/v) con un ratio de flujo de 0,4 ml/min y siguiendo la metodología descrita en otros estudios (Zhao et al., 2005, Laurindo et al., 2008). La producción de Etidio (E^+) y de 2-hidroxietidio (2-OH- E^+) fue monitorizada mediante fluorescencia a 480/580 nm excitación/emisión.

Para optimizar el análisis por HPLC, se hizo una incubación a 37 °C durante 30 min de DHE (5 μ M) y Xantina/Xantina Oxidasa (en un ratio de 0-50 μ M y 0,1 U/ml). La incubación se realizó en un buffer compuesto por (en mM) 7,78 Na_2HPO_4 ; 2,20 KH_2PO_4 ; 140 NaCl y 2,73 KCl; a pH 7.4 y con DTPA/PBS (100 μ M). Posteriormente, se analizaron las muestras mediante HPLC con el fin de obtener las condiciones óptimas para detectar los diferentes subproductos de la oxidación del DHE, y para poder determinar el pico que representa al producto derivado de la oxidación del DHE inducida específicamente por el $O_2^{\cdot -}$ (2-OH- E^+) (Figura 9).

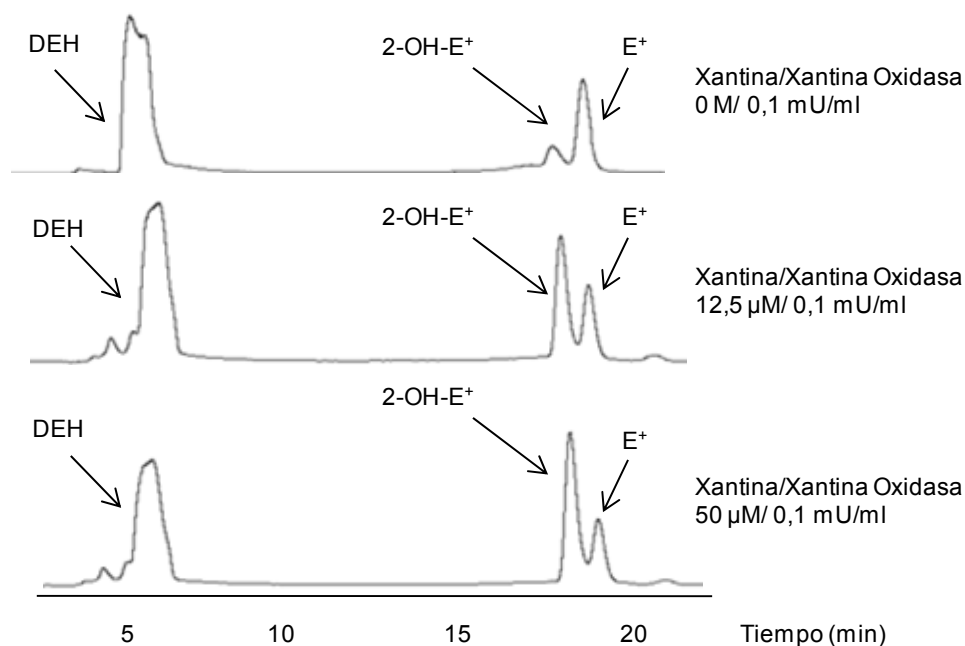


Figura 9. Cromatograma que refleja los picos que representan a los distintos productos derivados de la oxidación del DHE.

4.5. Medida de liberación de NO.

Los segmentos aórticos extraídos de los ratones tratados con CCN2(IV) y de los ratones control, se equilibraron en primer lugar con KHS-HEPES (60 min, 37 °C) y posteriormente se incubaron con 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA; 2 μM; 45 min). El DAF-2 DA, es un fluorocromo que penetra en la célula y puede interaccionar con el NO dando lugar al compuesto fluorescente triazolofluoresceína (DAF-2T) el cual puede ser monitorizado. El medio de incubación, sin los segmentos aórticos, se recogió en una placa negra de 96 pocillos y se realizó una primera medida de fluorescencia para determinar la liberación basal de NO. Las mediadas de fluorescencia se realizaron utilizando un espectrofluorímetro (FLUOstar OPTIMA; BMG Labtech; excitación/emisión a 492/515 nm). A continuación, se añadieron los segmentos aórticos a la placa, se incubaron con fenilefrina (1 μM, 1 min) y acetilcolina (ACh; 10 μM, 1 min) y se realizó una segunda medida de fluorescencia. La liberación del NO inducido se calculó restando la producción basal de NO de la inducida por la incubación con ACh. Las cantidades de NO liberado se expresaron como unidades arbitrarias frente al peso del tejido.

5. Estudios proteicos.

La obtención de proteínas del tejido aórtico se realizó pulverizando las muestras congeladas en un troquel y recogiendo el pulverizado obtenido en un tampón de lisis compuesto por: Tris-HCl (50 mM), NaCl (150 mM), EDTA (2 mM); EGTA (2 mM); Triton X-100 (0,2 %); NP-40 (0.3 %); PMSF (1 mM), coctel de inhibidores de proteasas (1 μl/ml), NaF (25 mM); Na₃VO₄ (100 μM) y DTT (1 mM). Todos los reactivos utilizados en este punto se adquirieron en Sigma.

La obtención de proteínas a partir de células en cultivo se realizó levantando y recogiendo las células en el mismo tampón de lisis utilizado para las aortas. En ambos casos, tejido aórtico pulverizado y células en cultivo, se realizaron varios ciclos de agitación durante 15 segundos seguidos de 20 min de reposo en hielo. Finalmente se centrifugaron los tubos a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante fue transferido a un tubo limpio para su crioconservación. La concentración de proteínas en las muestras se determinó mediante el método del BCA.

5.1. Técnica de western blot.

Las proteínas extraídas fueron separadas en geles de SDS-poliacrilamida (8-12 %) en condiciones reductoras. Una vez separadas en el gel, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon durante una hora, para evitar uniones inespecíficas, utilizando leche desnatada en polvo (5 % en TBS), y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (diluido en la solución de bloqueo; (Tabla 2)) a 4 °C durante la noche y en rotación constante. Al día siguiente, se lavaron tres veces en TBS con Tween-20 (TBST) al 0,1 % en ciclos de 10 min. Por último, las membranas fueron incubadas durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente (Amersham) (Tabla 2) y lavadas 3 veces con TBST en ciclos de 10 min. Las bandas de proteínas se detectaron por quimioluminiscencia usando el kit ECL (GE Healthcare) y revelando las membranas con el sistema ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Posteriormente, las imágenes obtenidas se analizaron con el programa Quantity One (Bio-Rad).

	Dilución Anticuerpo Primario	Dilución Anticuerpo Secundario	Casa comercial
p-p65	1/2000	Anti-conejo peroxidasa 1/2500	Cell Signaling
eNOS	1/1000	Anti-conejo peroxidasa 1/2500	BD Biosciences
p-EGFR	1/250	Anti-conejo peroxidasa 1/2500	Calbiochem
p-IkB α	1/1000	Anti-conejo peroxidasa 1/2500	Santa Cruz Biotechnology
p65 total	1/2500	Anti-conejo peroxidasa 1/2500	Santa Cruz Biotechnology
GAPDH	1/10000	Anti-ratón peroxidasa 1/5000	Millipore
β -Actina	1/5000	Anti-ratón peroxidasa 1/5000	Santa Cruz Biotechnology

Tabla 2. Anticuerpos y concentraciones utilizadas para detectar niveles de proteína por *western blot*.

5.2. Técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

Para evaluar los niveles de producción de determinadas citoquinas se utilizaron ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Las proteínas obtenidas de las aortas se diluyeron para conseguir la misma concentración en todas las muestras (10 ng/ml). Posteriormente se utilizaron 10 µl de cada muestra para determinar los niveles de IL-6 o de TGF-β siguiendo las indicaciones de la casa comercial (BD Bioscience). Para realizar una recta patrón y poder calcular los niveles exactos de ambas citoquinas, se utilizaron diferentes concentraciones de IL-6 y TGF-β recombinantes.

5.3. Inmunofluorescencia en células en cultivo.

Una vez transcurrido el tiempo de los tratamientos en las placas de 24 pocillos con cubreobjetos de cristal, se retiró el medio, se realizaron varios lavados con suero salino frío y se fijaron las células con PFA 4 %. A continuación se incubaron durante 15 min con una solución al 0,1 % de Triton X-100 (Sigma) en frío para permeabilizar la membrana celular. Pasado este tiempo, se lavaron y se bloquearon durante 1 hora a Tª ambiente con BSA al 4 % en TBS, para eliminar posibles uniones inespecíficas. Una vez bloqueadas, se incubaron con el anticuerpo primario (p65; 1/200; Santa Cruz) durante toda la noche a 4 °C y posteriormente con el anticuerpo secundario (AlexaFluor 488; 1/300; Invitrogen) durante 1 hora a Tª ambiente. Entre los diferentes pasos, las muestras se lavaron con TBST al 0,05 %. Los núcleos se contrastaron con DAPI y finalmente los cubreobjetos, con las células adheridas, se montaron con Mowiol 40-88 sobre portaobjetos de cristal para su posterior análisis por microscopía confocal.

6. Estudios histológicos e inmunohistoquímicos.**6.1. Evaluación del tejido conectivo en aorta.**

Las secciones de aorta incluidas en parafina se procesaron en secciones de 5 µm, utilizando un micrótom, y se montaron en portaobjetos de carga positiva (Dako). Las muestras se mantuvieron a 60°C durante 1 hora, se incluyeron 10 min en Xilol y posteriormente se pasaron por un gradiente decreciente de alcohol etílico (100°: 5 min, 96°: 5 min y 70°: 5 min), para desparafinar e hidratar el tejido. Finalmente, se realizó una tinción con la técnica del rojo sirio (Puchtler et al., 1973) para determinar el contenido en colágenos. Las muestras se analizaron utilizando un microscopio con luz polarizada.

6.2. Estudios inmunohistoquímicos.

Las tinciones inmunohistoquímicas (IHQ) se realizaron para detectar la presencia, niveles y localización de diferentes proteínas. Las secciones de aorta incluidas en parafina se procesaron en secciones de 5 µm, usando un micrótom, y se montaron en portaobjetos de carga positiva. Los cortes se mantuvieron durante 1 hora a 60 °C y posteriormente se desparafinaron y recuperaron los epítomos utilizando el sistema PT-link de Dako, ajustando el pH a las indicaciones

especificadas por el fabricante para cada anticuerpo (Tabla 3). La peroxidasa endógena se bloqueó incubando las muestras durante 10 min con H_2O_2 al 3 %, mientras que las uniones inespecíficas del anticuerpo primario se bloquearon utilizando una solución de PBS/BSA 4 % durante 1 hora. Posteriormente se incubaron las muestras con el anticuerpo correspondiente a 4 °C durante toda la noche (Tabla 3). Al día siguiente se lavaron las muestras con PBS, y se incubaron 1 hora con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (Amersham). A continuación, se lavaron con PBS y se incubaron con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite ABC system; Vector) durante 30 min a 37 °C. Finalmente, las muestras se revelaron utilizando la 3,3'-diaminobencidina como sustrato (Dako), se contrastaron con hematoxilina, se montaron con cubreobjetos de cristal utilizando DPX (Sigma) y se estudiaron por microscopía.

	Dilución y pH del Ac. Primario	Dilución del Ac. Secundario	Casa comercial
CTGF	1/500; pH 6	Anti-conejo biotinilado 1/250	Sigma
p-p65 (Serina 536)	1/50; pH 6	Anti-conejo biotinilado 1/250	Cell Signaling
p-EGFR (Tirosina 1068)	1/1000; pH 6	Anti-conejo biotinilado 1/250	Cell Signaling
3-Nitrotirosina	1/250; pH 6	Anti-ratón biotinilado 1/250	Abcam

Tabla 3. Anticuerpos y concentraciones utilizadas para detectar niveles de proteína por IHQ.

7. Estudios genéticos.

La obtención del ARN total del tejido aórtico congelado en nitrógeno líquido se llevó a cabo mediante su pulverización en un troquel y un lisado tisular posterior con Trizol (Invitrogen), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. El ARN obtenido se cuantificó y se utilizó para obtener ADNc, empleando para ello un Kit de alta capacidad de síntesis de ADNc (Applied). Los niveles de ADNc de los genes a estudio fueron determinados utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real mediante el sistema de detección de secuencias *Real-Time FAST PCR 7500* (Life Technologies). Se realizó un estudio multiplex empleando sondas de hibridación para cada gen a estudiar y, como control para normalizar los datos, se utilizó una sonda para el gen del ribosoma 18s eucariota (Tabla 4). El número de ciclos y las temperaturas utilizadas fueron las siguientes: un primer paso con 1 ciclo de 2 min a 50 °C, un segundo paso con un ciclo de 10 min a 95 °C y un tercer paso, con 40 ciclos, formado por una etapa de 15 segundos a 95 °C seguida de otra etapa de 60 segundos a 60 °C, siendo en esta última etapa de cada ciclo en la que se recogieron las medidas. Todas las sondas fueron adquiridas en Applied Biosystems. Todas las medidas fueron realizadas por duplicado, utilizando H_2O como control negativo. El

número de copias de ARNm se calculó usando el programa incluido en el instrumental a partir del valor Ct (ciclo umbral). Los resultados se normalizaron con sus correspondientes valores de 18s.

	Fluoróforo/Especie	Número identificador
MCP-1	FAM/ratón	Mm00441242_m1
RANTES	FAM/ratón	Mm01302428_m1
IL-6	FAM/ratón	Mm00446190_m1
TGF- β	FAM/ratón	Mm01178819_m1
ICAM-1	FAM/ratón	Mm00516023_m1
TNF α	FAM/ratón	Mm00443258_m1
18s ARN	VIC/ eucariota	4310893E

Tabla 4. Listado de las sondas utilizadas para el análisis génico por PCR a tiempo Real.

8. Estudios de la reactividad vascular.

Para evaluar la reactividad vascular, las aortas, tanto de ratones tratados *in vivo* como las utilizadas para realizar experimentos *ex vivo*, se recogieron cuidadosamente y se eliminaron los restos de tejido conjuntivo y adiposo que pudieran tener adheridos. Las aortas, fueron divididas en segmentos de unos 2 mm de longitud para montarlos en un miógrafo de alambres (DMT; modelo 620M) mediante la inserción de dos alambres de acero inoxidable a través del lumen de cada segmento aórtico. Uno de los alambres se fijó a la pared del baño, mientras que el otro se conectó a un transductor isométrico de fuerza-desplazamiento. Los diferentes segmentos se mantuvieron con 5 ml de la solución KHS y en unas condiciones constantes de 37 °C y burbujeo con O₂ al 95 % y CO₂ al 5 % para conservar un pH de aprox 7.4. Los anillos se tensaron hasta obtener el diámetro óptimo y se expusieron a una solución alta de potasio (K⁺-KHS, 120 mM) para testar su contractibilidad. Para determinar la presencia de endotelio, las arterias fueron precontraídas con fenilefrina aproximadamente hasta un 50 % de la contracción obtenida con K⁺-KHS y, posteriormente, se comprobó la capacidad de relajación de las mismas mediante la adición de ACh (10 μ M). Algunos segmentos fueron desprovistos de la capa endotelial mediante fricción mecánica.

Para evaluar la respuesta contráctil dependiente de endotelio, se realizaron curvas de respuesta contráctil ante concentraciones crecientes de fenilefrina (desde 1 nM a 30 μ M) añadidas de manera acumulativa. Para evaluar la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio, se realizaron curvas de concentración-respuesta de la relajación ante concentraciones crecientes de

ACh (desde 1 nM a 10 μ M) añadida de manera acumulativa, en los segmentos precontraídos previamente con fenilefrina (hasta el 50 % de la concentración obtenida con K^+ -KHS). Para evaluar las respuestas no dependientes de endotelio, se realizaron los mismos procedimientos pero en los segmentos aórticos desprovistos de endotelio.

9. Citometría de flujo.

La aorta se digirió con una solución de PBS, inhibidores de proteasas (1 μ l/ml) y PMSF (1 mM), y posteriormente fue filtrada en tubos con tapón de filtro (BD Bioscience) para obtener una suspensión unicelular. Las células (1×10^5) fueron marcadas en la superficie celular con los anticuerpos monoclonales anti-CD45-FITC, F4/80 PE-Cy7 y CD4-APC (Biolegend) durante 30 minutos a 4 °C. Seguidamente se lavaron 3 veces con 2 ml de PBS por cada centrifugación (1500 rpm; 5 min) para eliminar los restos de anticuerpo no unido. Las fluorescencias negativas se definieron utilizando controles isotípicos. Las muestras se adquirieron en el analizador celular BD FACS Canto™ II (BD Bioscience) y se estudiaron con el software BD FACSDiva (BD Bioscience).

10. Análisis estadístico.

La cuantificación de las tinciones inmunohistoquímicas fue realizada con el *software Image Pro-Plus*, realizando medidas de 4 campos visuales de una magnitud de 200x en cada muestra. Los resultados se muestran como el porcentaje del área teñida respecto del área total y están representados como la media \pm el error estándar de la media (EEM). Los resultados de los análisis de niveles de proteína, ARNm, anión superóxido y de la actividad NAD(P)H oxidasa, se expresaron como incrementos de n-veces respecto al control correspondiente y están representados como la media \pm EEM. Los resultados de contracción se expresaron como el porcentaje de contracción con respecto a la respuesta máxima obtenida con K^+ -KHS. Los resultados de relajación se representaron como el porcentaje de relajación con respecto a la contracción previa realizada con fenilefrina.

El análisis estadístico de todos los resultados se realizó utilizando el *software* estadístico SPSS versión 11.0. Lo primero que se comprobó fue que las muestras fueran normales (prueba de Kolmogorov – Smirnov), y en los casos en los que este supuesto se cumplió, se realizó un análisis comparativo de las medias utilizando el test paramétrico T-Student. En los casos en los que las muestras no eran normales, se realizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. En cualquiera de los casos las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

RESULTADOS

1. La sobreexpresión de CCN2 en un modelo experimental de daño vascular inducido por Ang II, está asociada a un aumento en la producción de ROS.

Existen numerosos estudios donde se describen niveles elevados de ROS en diferentes patologías vasculares (Sirker et al., 2011). Además, se ha observado también un aumento en la expresión tisular de CCN2 en este tipo de patologías (Cicha et al., 2005). Sin embargo, la relación directa entre el CCN2 y el estrés oxidativo no está claramente esclarecida. Teniendo en cuenta estos antecedentes, lo primero que se quiso evaluar fue si la inducción de CCN2 y el aumento en los niveles de producción de ROS estaban presentes al mismo tiempo en las CMLVs aórticas de un modelo de daño vascular. Para ello, se utilizó un modelo de administración sistémica de Ang II en ratón ya que, además de ser un modelo caracterizado por inducir inflamación y fibrosis vascular (Briones et al., 2009; Ruiz-Ortega et al., 2006; Ruperez et al., 2006; Savoia y Schiffrin, 2007; Virdis et al., 2011), diferentes estudios han demostrado la implicación de los procesos redox en el desarrollo del daño generado por la Ang II (Briones y Touyz, 2010; Martínez-Revelles et al., 2013; Virdis et al., 2011). En los ratones infundidos con Ang II (1000 ng/kg/min) durante 7 días se observó un incremento en la expresión de CCN2 en aorta tanto a nivel génico, mediante estudios de PCR a tiempo real (Figura 10 A), como a nivel proteico, utilizando una tinción IHQ que reveló que el aumento se localizaba principalmente en las CMLVs (Figura 10 B). Por otro lado, en secciones seriadas de aorta, se estudió la producción *in situ* de $O_2^{\cdot-}$ mediante tinción indirecta con DHE. Los estudios por microscopía confocal, reflejaron un aumento en la oxidación del DHE, lo que indicaba que existía un incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ en las aortas de los ratones tratados con Ang II. Además, este estudio mostró que el aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ coincidía con la zona de producción de CCN2 (Figura 10 B), lo que parecía indicar que el CCN2 podría estar involucrado en la producción de $O_2^{\cdot-}$ en el daño vascular.

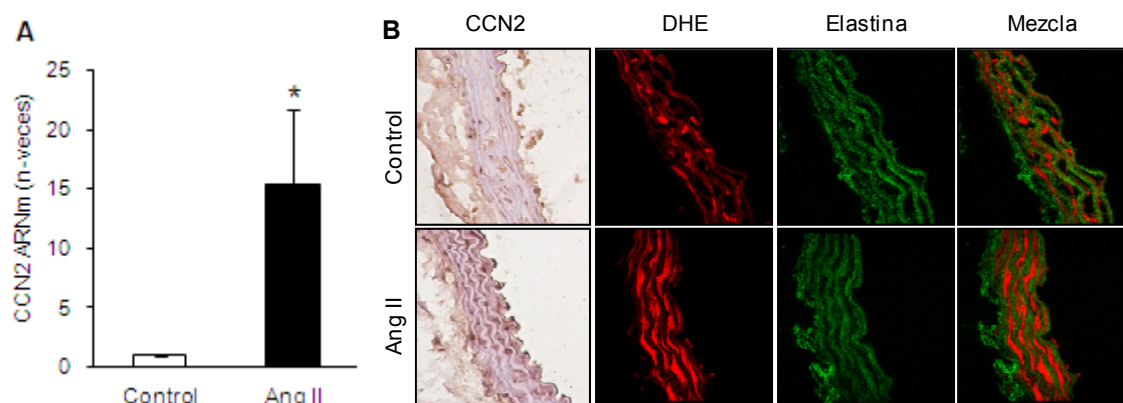


Figura 10. Niveles de CCN2 y producción de $O_2^{\cdot-}$ en aorta de ratón. (A) La gráfica muestra los niveles de ARNm de CCN2, determinados mediante PCR a tiempo real, en aortas de ratones tratados con Ang II (1000 ng/kg/min; 7 días) y en ratones control (n= 9-10 ratones por grupo). Los datos se expresan como la media \pm EEM de 9-10 animales por grupo normalizados frente al grupo control. *p <0,05 vs. Control. (B) Microfotografías representativas de una IHQ de CCN2 y de las fluorescencias emitidas por la oxidación del DHE (rojo) y por la autofluorescencia de la elastina (verde), en las aortas de los diferentes grupos estudiados.

2. CCN2(IV) regula procesos redox a nivel vascular.

Para demostrar si realmente CCN2(IV) podía regular de manera directa procesos redox, se evaluaron sus efectos a diferentes niveles: *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

2.1. CCN2(IV) aumentó la producción de $O_2^{\cdot-}$ en CMLVs y en CEs de ratón en cultivo, e incrementó la actividad NAD(P)H oxidasa en CMLVs.

Para determinar si el tratamiento de CMLVs de ratón en cultivo con CCN2(IV) producía un aumento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$, se realizaron experimentos con varias concentraciones de CCN2(IV) durante diferentes tiempos. Mediante microscopía confocal, se observó un aumento dosis y tiempo dependiente en los niveles de fluorescencia roja, derivados de la oxidación del DHE por el $O_2^{\cdot-}$, en las CMLVs tratadas con CCN2(IV) (Figura 11 A y 11 B), siendo la dosis y tiempo de máxima respuesta 50 ng/ml durante 1 h. Teniendo estos estudios como referencia, a partir de este punto se utilizaron estas condiciones de tiempo y de dosis para el resto de experimentos con CCN2(IV) *in vitro*.

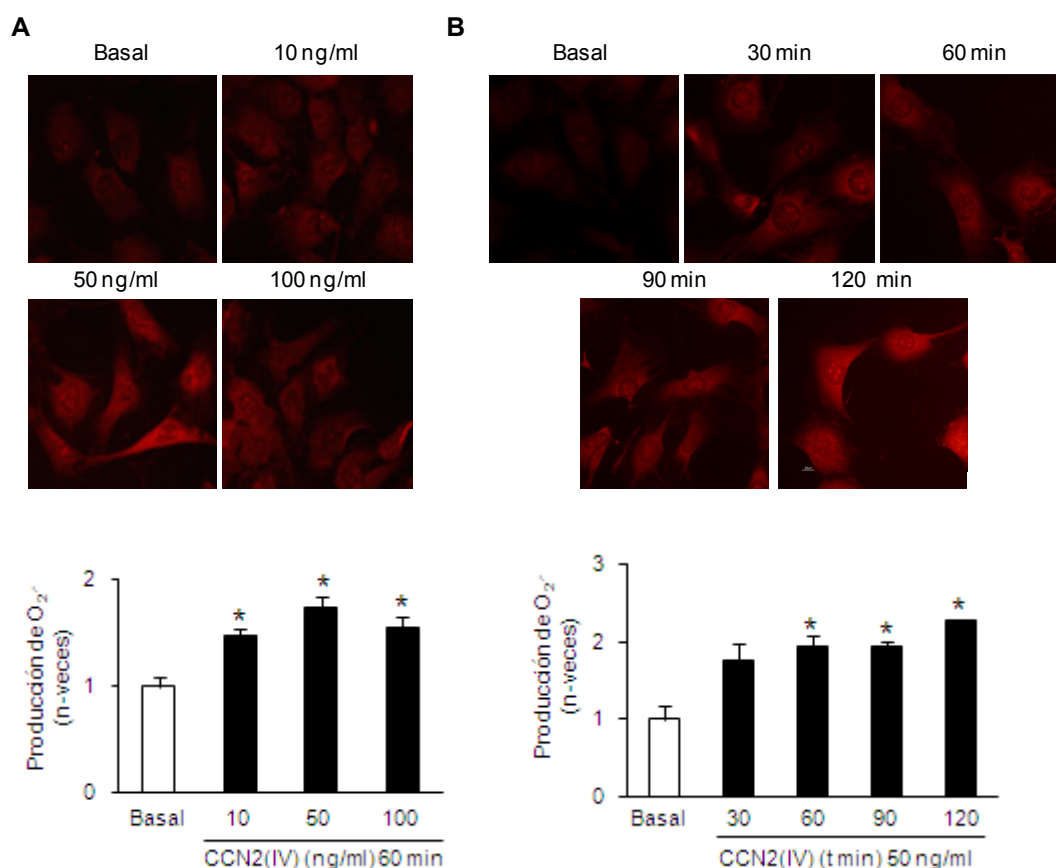


Figura 11. Producción de $O_2^{\cdot-}$ en CMLVs de ratón *in vitro* evaluada por microscopía confocal. Los paneles superiores muestran microfotografías representativas de la fluorescencia emitida por la oxidación del DHE (rojo) en CMLVs de ratón tratadas con CCN2(IV) a diferentes dosis (**A**) y tiempos (**B**). Los paneles inferiores de cada una de las figuras muestran la cuantificación de la fluorescencia roja observada en las diferentes condiciones del estudio. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 4 experimentos independientes normalizados frente al basal. * $p < 0,05$ vs. Basal.

A continuación, se quiso investigar si el CCN2(IV) producía la misma respuesta en CEs de ratón en cultivo. Para ello, se incubaron las CEs con varias concentraciones de CCN2(IV) durante 60 minutos y se realizó un estudio de la oxidación del DHE por microscopía confocal. Los resultados reflejaron que el tratamiento con CCN2(IV) en CEs también generaba un incremento en la producción de $O_2^{\cdot-}$, mostrando una respuesta máxima con la dosis de 50 ng/ml (Figura 12).

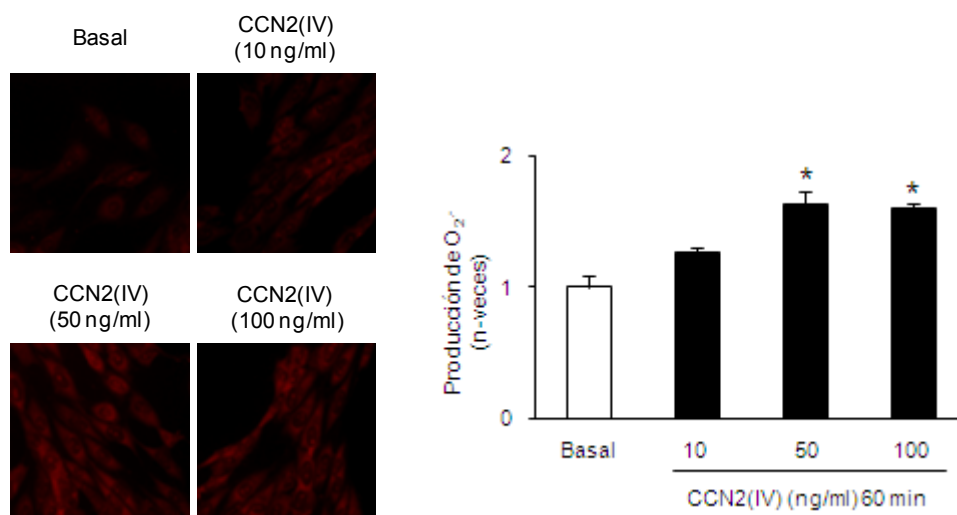


Figura 12. Producción de $O_2^{\cdot-}$ en CEs de ratón *in vitro* evaluada por microscopía confocal. El panel de la izquierda muestra microfotografías representativas de la fluorescencia emitida por la oxidación del DHE (rojo) en CEs de ratón tratadas con CCN2(IV) a diferentes dosis durante 60 min. En la parte derecha se muestra la cuantificación de la fluorescencia roja obtenida en las diferentes condiciones del estudio. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 4 experimentos independientes normalizados frente al basal. * $p < 0,05$ vs. Basal.

Estudios recientes, han sugerido que las técnicas de microscopía confocal para estudiar la oxidación del DHE pueden no indicar específicamente la producción de $O_2^{\cdot-}$, ya que el DHE puede dar lugar a dos subproductos, uno de ellos específico de su oxidación por $O_2^{\cdot-}$ (2-OH- E^+) y otro inespecífico (E^+). Ambos subproductos emiten fluorescencia roja, por lo que su evaluación mediante microscopía confocal podría no dar unos resultados totalmente fiables (Zielonka et al., 2010). Debido a estas dudas publicadas sobre el uso de la microscopía confocal para esta técnica y para demostrar más específicamente los resultados obtenidos anteriormente, se realizaron medidas mediante HPLC, a través de las cuales sí se pueden detectar los dos subproductos derivados de la oxidación del DHE y determinar con exactitud los niveles de $O_2^{\cdot-}$. Además, para determinar si la enzima Nox1 estaba implicada en el incremento de $O_2^{\cdot-}$ observado anteriormente, las CMLVs fueron preincubadas con un inhibidor farmacológico selectivo de Nox1 (ML-171) (Gianni et al., 2010) antes del tratamiento con CCN2(IV). El cromatograma obtenido tras analizar las muestras por HPLC, mostró un incremento en el pico correspondiente a la oxidación específica del DHE por $O_2^{\cdot-}$ en las CMLVs tratadas CCN2(IV) en comparación con las células en estado basal. También se observó que con el pretratamiento con ML-171, los niveles del pico específico de oxidación del DHE por $O_2^{\cdot-}$ eran similares a los obtenidos en las CMLVs sin tratar (Figura 13).

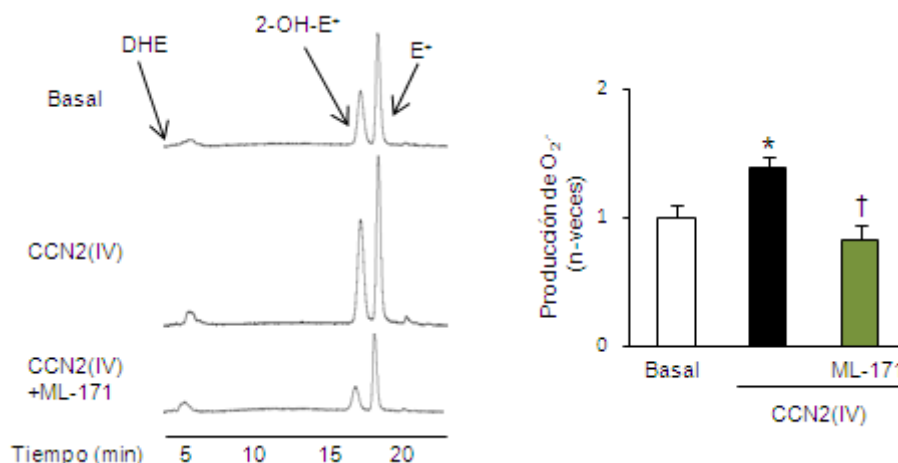


Figura 13. Producción de $O_2^{\cdot-}$ en CMLVs de ratón *in vitro* evaluada por HPLC. El panel de la izquierda muestra un cromatograma representativo de las CMLVs, tratadas con CCN2(IV) (50 ng/ml; 60 min) o pretratadas con ML-171 (1 μ M), incubadas posteriormente con DHE y analizadas por HPLC. Las flechas señalan los picos que representan el DHE sin oxidar, el producto de su oxidación por $O_2^{\cdot-}$ (2-OH- E^+) y el producto de su oxidación independiente del $O_2^{\cdot-}$ (E^+). El panel de la derecha muestra la cuantificación del $O_2^{\cdot-}$ obtenida con los diferentes tratamientos. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3 experimentos independientes normalizados frente al al basal. *p <0,05 vs. Basal; † p<0,05 vs. CCN2(IV).

Mediante estudios de quimioluminiscencia con la sonda L-012, la cual permite también determinar la producción de $O_2^{\cdot-}$, se observaron resultados similares a los obtenidos con los análisis de la oxidación del DHE, de tal forma que el tratamiento con CCN2(IV) producía un incremento en los niveles de $O_2^{\cdot-}$ en comparación con las células en estado basal, tanto en CMLVs como en CEs (Figura 14 A y 14 B).

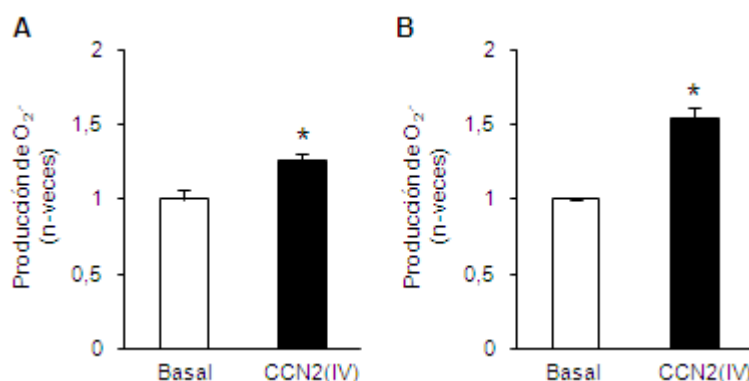


Figura 14. Producción de $O_2^{\cdot-}$ en CMLVs y CEs de ratón *in vitro* evaluada por quimioluminiscencia. Las gráficas muestran la cuantificación de los niveles de ROS obtenidos por quimioluminiscencia del reactivo L-012, en CMLVs (A) y CEs (B) de ratón en cultivo, tratadas con CCN2(IV) (50 ng/ml; 60 min). Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados frente al basal. * p <0,05 vs. Basal.

Por último, para determinar los efectos del CCN2(IV) sobre la actividad enzimática NAD(P)H oxidasa, se realizó una curva de tiempos tratando las CMLVs con CCN2(IV). La actividad enzimática, determinada mediante estudios de quimioluminiscencia con lucigenina, reflejó que existía un aumento significativo en la actividad NAD(P)H oxidasa en las células tratadas con CCN2(IV) en comparación con las células control, con un pico máximo de actividad tras 60 minutos de incubación (Figura 15).

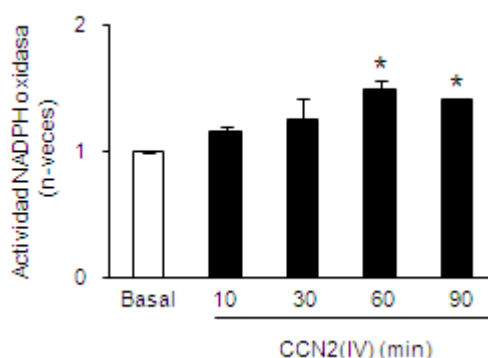


Figura 15. Cuantificación de la actividad NAD(P)H oxidasa en CMLVs. La gráfica muestra la actividad NAD(P)H oxidasa, determinada mediante estudios de quimioluminiscencia con lucigenina, en CMLVs tratadas con CCN2(IV) (50 ng/ml) a diferentes tiempos. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3 experimentos independientes normalizados frente al basal. * $p < 0,05$ vs. Basal.

2.2. CCN2(IV) aumentó la producción de $O_2^{\cdot-}$ y la actividad NADP(H) oxidasa en aorta de ratón *ex vivo*.

Lo primero que se hizo fue determinar si CCN2(IV) era capaz de unirse a segmentos de aorta *ex vivo*, para lo cual, se utilizó CCN2(IV) marcado con la sonda fluorescente Cy5 que emite en rojo lejano (CCN2(IV)-Cy5). Se incubaron varios segmentos de aorta con CCN2(IV)-Cy5 a diferentes tiempos y, posteriormente, se fijaron en OCT para analizarlos por microscopía confocal. Los resultados mostraron que, tras 5 y 10 minutos, el CCN2(IV)-Cy5 se encontraba presente en las CMLVs de los segmentos aórticos, indicando que CCN2(IV) era capaz de atravesar la capa endotelial e interactuar con las CMLVs (Figura 16).

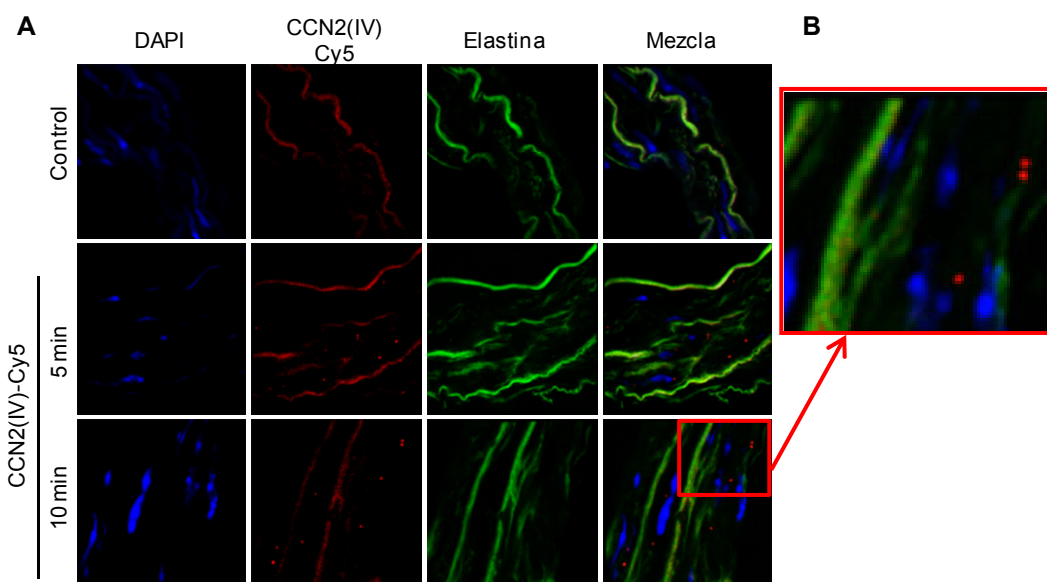


Figura 16. Localización de CCN2(IV)-Cy5 en aortas de ratón *ex vivo* mediante microscopía confocal. (A) Muestra microfotografías representativas de 4 estudios independientes, donde se determina la localización de CCN2(IV)-Cy5 en la pared vascular de la aorta tras diferentes tiempos de incubación con CCN2(IV)-Cy5 (100 ng/ml). Se muestran imágenes de la fluorescencia del CCN2(IV)-Cy5 (rojo), la autofluorescencia de la elastina (verde) y la fluorescencia del DAPI (azul) que se utilizó para contrastar los núcleos. (B) Muestra una imagen ampliada de la microfotografía con la mezcla de los 3 canales de fluorescencia tras 10 min de incubación con CCN2(IV)-Cy5.

Una vez demostrada la capacidad de CCN2(IV) de incorporarse a la capa media de las aortas, se quiso determinar si, en la aorta, CCN2(IV) producía efectos similares a los observados en las CMLVs *in vitro*. Para ello, se incubaron segmentos de aorta de ratón con CCN2(IV) y se estudió la producción de $O_2^{\cdot-}$. Los estudios de la oxidación del DHE en los segmentos aórticos, realizados por microscopía confocal fluorescente, reflejaron que existía un aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ en los segmentos las aortas de los ratones tratados con CCN2(IV) en comparación con los ratones control y que, aunque este aumento estaba localizado principalmente en CMLVs, también aparecía en menor medida en algunas CEs (Figura 17). El tratamiento previo de los segmentos aórticos con Tiron (un secuestrador de $O_2^{\cdot-}$) redujo los niveles de fluorescencia roja detectados en los segmentos tratados con CCN2(IV) hasta niveles similares a los observados en los segmentos control (Figura 17), lo cual sirvió para demostrar la especificidad de la técnica.

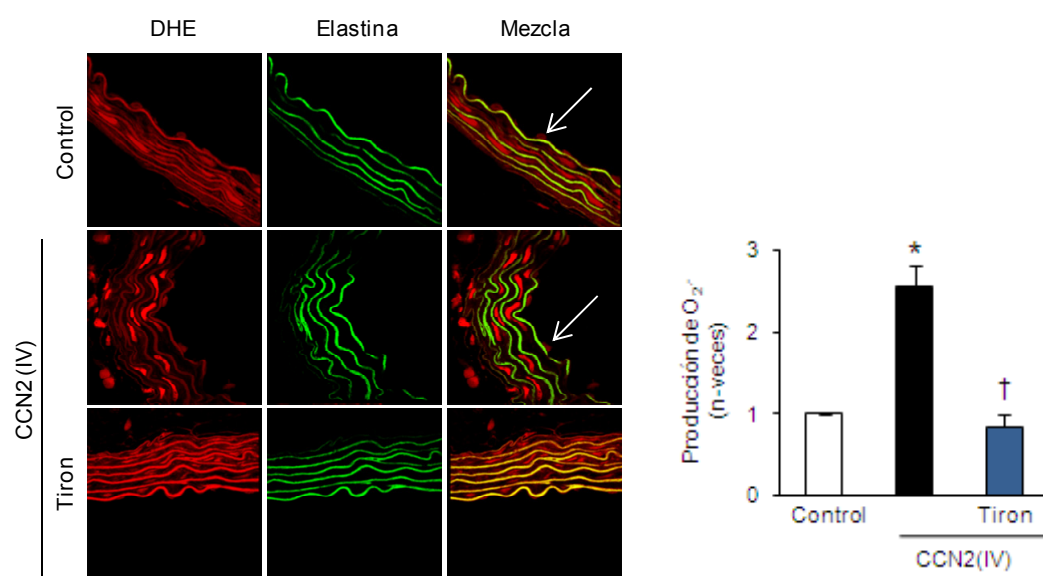


Figura 17. Producción de $O_2^{\cdot-}$ en aorta de ratón *ex vivo* evaluada por microscopía confocal. El panel de la izquierda muestra microfotografías representativas de la fluorescencia emitida por la oxidación del DHE (rojo) y de la autofluorescencia de la elastina (verde), en aortas tratadas con CCN2(IV) (50 ng/ml; 60 min). Las flechas muestran la producción de $O_2^{\cdot-}$ en CEs. El Tiron (100 μ M) fue utilizado como control de la técnica. El panel de la derecha muestra la cuantificación de la fluorescencia roja obtenida con los diferentes tratamientos. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3 experimentos independientes normalizados frente al control. *p < 0,05 vs. Control; † p < 0,05 vs. CCN2(IV).

Para confirmar estos resultados, se realizaron nuevos estudios por HPLC para evaluar la oxidación del DHE en los segmentos aórticos tratados con CCN2(IV). Los datos obtenidos reflejaron que existía un aumento del pico específico de oxidación del DHE por $O_2^{\cdot-}$ en los segmentos aórticos tratados con CCN2(IV) en comparación con los segmentos sin tratar y que, además, el pretratamiento de los segmentos con ML-171 durante 60 minutos, inhibía estos efectos (Figura 18). Estos resultados, por tanto, sirven para confirmar que el tratamiento con CCN2(IV) produce un aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ en aorta de ratón *ex vivo*, y que este a su vez está mediado por la enzima Nox1.

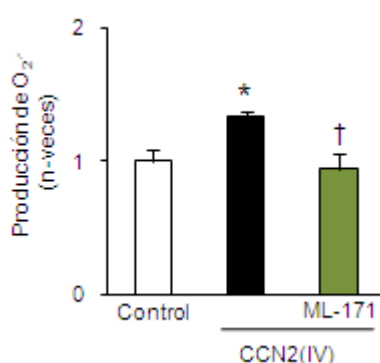


Figura 18. Producción de O_2^- en aorta de ratón *ex vivo* analizada por HPLC. La gráfica muestra la cuantificación del O_2^- en segmentos aórticos de ratón, tratados 60 min con CCN2(IV) (50 ng/ml) solo o preincubados también con ML-171 (1 μ M), incubados posteriormente con DHE y analizados por HPLC. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3 experimentos independientes normalizados frente control. *p <0,05 vs. Control; † p <0,05 vs. CCN2(IV).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios anteriores, se quiso evaluar si CCN2(IV) generaba un aumento en la actividad NAD(P)H oxidasa en los segmentos aórticos. Para ello, se realizó un estudio de quimioluminiscencia con lucigenina, el cual reveló que, mientras que en los segmentos aórticos tratados con CCN2(IV) existía un incremento en la actividad enzimática, en los segmentos pretratados con ML-171 la actividad NAD(P)H oxidasa se encontraba en niveles similares a los observados en los segmentos control (Figura 19).

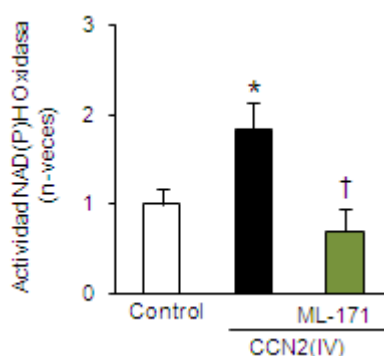


Figura 19. Cuantificación de la actividad NAD(P)H oxidasa en aorta de ratón *ex vivo*. La gráfica muestra la actividad NAD(P)H oxidasa, determinada mediante quimioluminiscencia con lucigenina, en segmentos aórticos de ratón tratados con CCN2(IV) (50 ng/ml) o preincubados con ML-171 (1 μ M) *ex vivo*. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3 experimentos independientes normalizados frente al control. * p <0,05 vs. Control; † p <0,05 vs. CCN2(IV).

Estos resultados en su conjunto reflejan que CCN2(IV), mediante la inducción de un incremento en actividad NAD(P)H oxidasa de Nox1, induce un aumento en la producción de O_2^- en aorta de ratón *ex vivo*.

2.3. CCN2(IV) reguló procesos redox en aorta de ratón *in vivo*.

2.3.1. La administración de CCN2(IV) aumentó la producción de $O_2^{\cdot-}$ y la actividad NAD(P)H oxidasa en aorta.

Para investigar si CCN2(IV) era capaz de regular también procesos redox *in vivo*, se realizó un modelo experimental de administración sistémica de CCN2(IV) por vía i.p. en ratones C57BL/6 y se evaluaron sus efectos en la aorta. El estudio de la oxidación del DHE, determinado por HPLC, reflejó que existía un aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ en las aortas de los ratones inyectados con CCN2(IV) a las 24 horas del tratamiento, en comparación con las aortas de los ratones control (Figura 20).

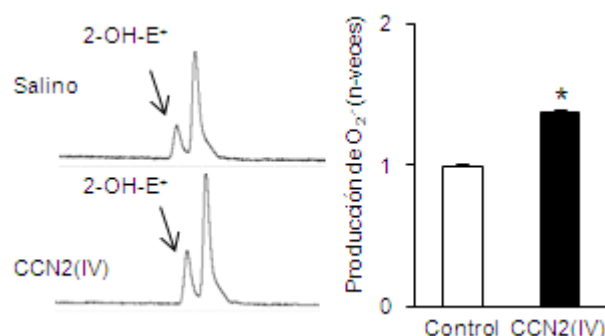


Figura 20. Producción de $O_2^{\cdot-}$ en aorta de ratón *in vivo* analizada por HPLC. El panel de la izquierda muestra un cromatograma representativo del análisis de las aortas incubadas con DHE mediante HPLC. Las flechas indican el pico del producto de la oxidación específica del DHE por $O_2^{\cdot-}$. El panel de la derecha muestra la cuantificación del $O_2^{\cdot-}$ en las aortas de los ratones tratados con CCN2(IV) (2,5 ng/g; 24 horas) y en las del grupo control. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 8-10 animales por grupo normalizados frente al grupo control. *p <0,05 vs. Control.

Del mismo modo, el análisis de la actividad enzimática NAD(P)H oxidasa, reflejó un aumento de la actividad en las aortas de los ratones tratados con CCN2(IV) en comparación con las aortas del grupo control (Figura 21 A). Sin embargo, no se observaron diferencias en los niveles de Nox1 entre las aortas de los diferentes grupos, ni a nivel génico ni a nivel proteico (Figura 21 B y C).

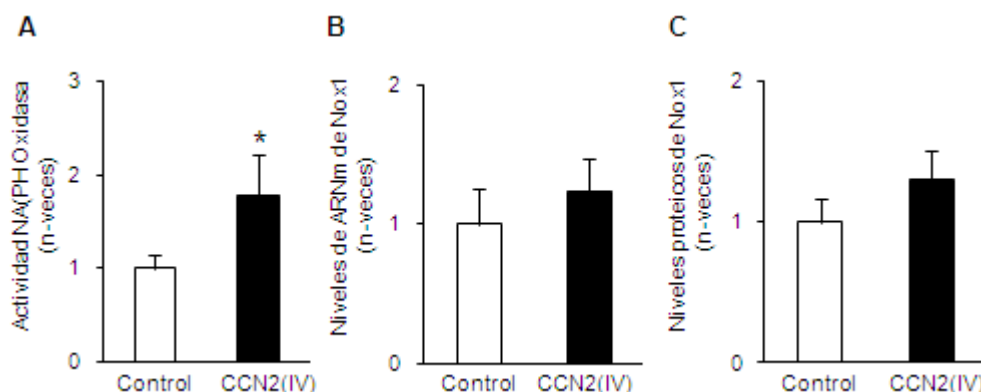


Figura 21. Medida de la actividad NAD(P)H oxidasa y de los niveles génicos y proteicos de Nox1 en aorta de ratón. Se muestra la cuantificación de la actividad NAD(P)H oxidasa determinada por quimioluminiscencia con lucigenina (A), los niveles de ARNm de Nox1 (B) y los niveles de proteína de Nox1 (C); obtenidos en las aortas de los ratones tratados con CCN2(IV) (2,5 ng/g; 24 horas) y en las del grupo control. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 8-10 animales por grupo normalizados frente al grupo control. *p <0,05 vs. Control.

2.3.2.Efectos del CCN2(IV) sobre la producción de óxido nítrico en aorta

El NO es un vasodilatador que puede ser sintetizado por tres enzimas óxido nítrico sintasas diferentes: la endotelial, la inducible y la neuronal (eNOS, iNOS y nNOS), y que actúa como un modulador importante del tono vascular (Moncada y Higgs, 2006). Para determinar si en las aortas de los ratones tratados con CCN2(IV) existía algún cambio en la síntesis de NO con respecto a las aortas de los ratones control, se realizó un estudio de producción de NO utilizando el fluorocromo DAF-2 DA, el cual reflejó que no había diferencias en la producción de NO entre las aortas de los diferentes grupos estudiados (Figura 22 A). Adicionalmente, los estudios por PCR a tiempo real, mostraron que había un incremento en los niveles de ARNm de la iNOS en las aortas del grupo tratado con CCN2(IV), mientras que el análisis por *western blot* no mostró diferencias significativas en los niveles proteicos de eNOS (Figura 22 B y C).

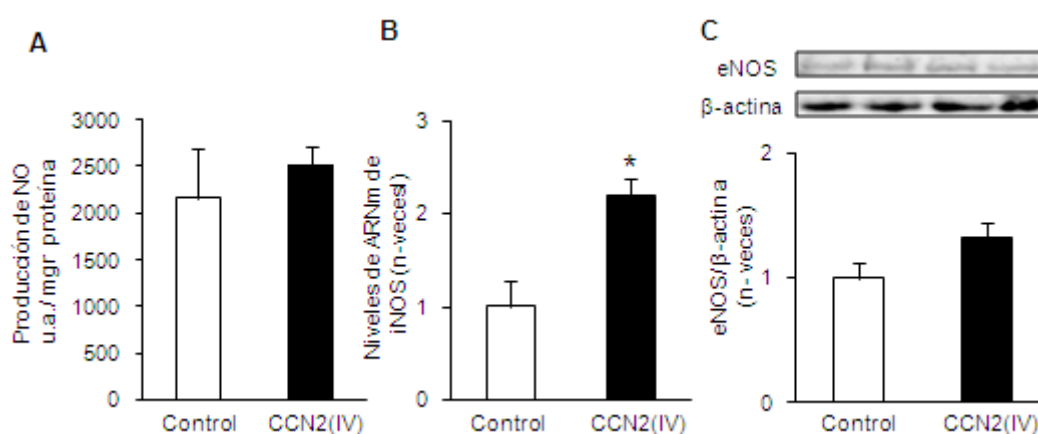


Figura 22. Cuantificación de NO, iNOS y eNOS en aorta de ratón. Se muestran los niveles de NO (A), determinados mediante quimioluminiscencia con DAF-2 DA, y de ARNm de iNOS (B), obtenidos por PCR a tiempo real. La figura C muestra un *western blot* representativo de eNOS, en la parte superior, y la gráfica con su cuantificación en la parte inferior. Las medidas se realizaron en aortas de ratones tratados con CCN2(IV) (2,5 ng/g; 24 horas) y en las aortas del grupo control. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 8-10 animales por grupo normalizados frente al grupo control. *p < 0,05 vs. Control.

Como se ha descrito anteriormente, el $O_2^{\cdot -}$ tiene la capacidad de oxidar el NO y reducir su biodisponibilidad. Esta reacción da lugar a la producción de peroxinitrito ($ONOO^-$), un RNS que puede conducir a la nitrosilación de residuos de tirosina y cisteína en proteínas tisulares y alterar su actividad (Pacher et al., 2007). Teniendo en cuenta esta reacción, se utilizó un anticuerpo frente a 3-nitrotirosina para evaluar los niveles de proteínas nitrosiladas, y se observó que en las aortas del grupo tratado con CCN2(IV) existía un incremento en los niveles de 3-nitrotirosina en comparación con las aortas del grupo control. Estos datos sugirieron, de manera indirecta, que CCN2(IV) producía un aumento en la formación de peroxinitrito (Figura 23).

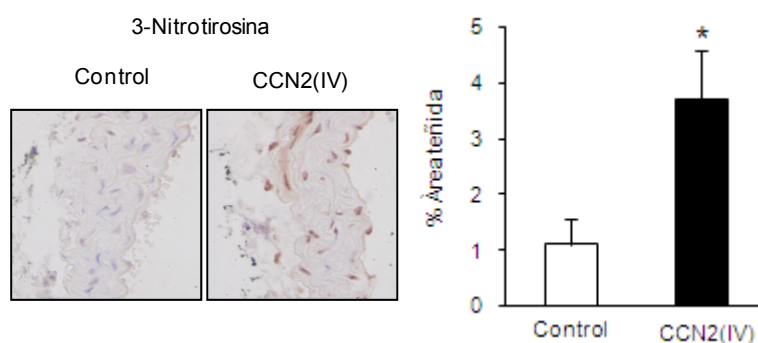


Figura 23. Cuantificación de los niveles de 3-Nitrotirosina en aorta de ratón. En la parte izquierda se observan microfotografías representativas de una tinción IHQ para detectar 3-Nitrotirosina. En la parte derecha se muestra la cuantificación de los niveles de 3-Nitrotirosina de las aortas de ratones tratados con CCN2(IV) (2,5 ng/g; 24 horas) y de ratones control. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 8-10 animales por grupo normalizados frente al grupo control. * $p < 0,05$ vs. Control.

3. CCN2(IV) regula el tono vascular y produce disfunción endotelial.

3.1. CCN2(IV) aumentó la respuesta contráctil vascular inducida por fenilefrina ex vivo, mediante procesos redox.

Está claramente descrita la importancia que juegan las ROS en la modulación del tono vascular (González et al., 2014). Teniendo en cuenta el aumento en la producción de $O_2^{\cdot -}$ observado en las células vasculares y en los segmentos aórticos de ratón tras el tratamiento con CCN2(IV), se quiso investigar si CCN2(IV) era capaz también de modular la función vascular aórtica. Para ello, utilizando un miógrafo de alambres, se realizó una curva de respuesta contráctil vascular frente a concentraciones crecientes de fenilefrina en segmentos aórticos de ratón tratados solo con CCN2(IV) o junto con diferentes fármacos. Este estudio reflejó un aumento en la respuesta contráctil a fenilefrina en los segmentos tratados con CCN2(IV) comparada con los segmentos control, mientras que en los segmentos cotratados también con ML-171 o con el antioxidante Apocinina la respuesta observada fue similar a la obtenida en los segmentos control. Estos resultados muestran la capacidad que tiene CCN2(IV) de modular la función vascular en aorta de ratón ex vivo, a través de la activación de procesos redox (Figura 24).

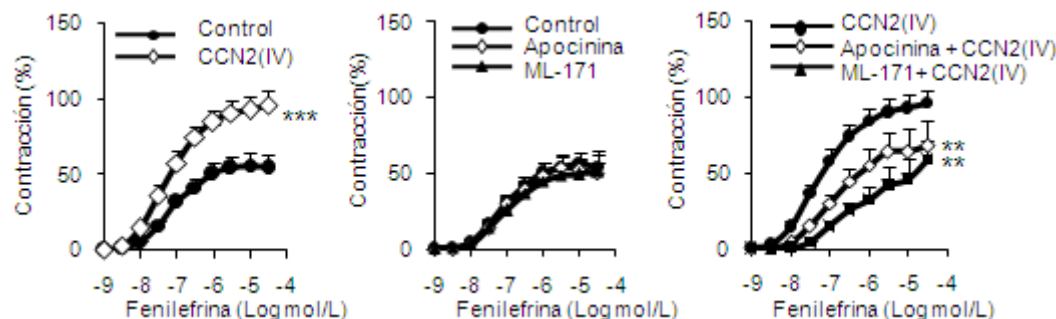


Figura 24. Evaluación de la respuesta contráctil vascular en aortas de ratón ex vivo. Las gráficas muestran la respuesta contráctil vascular, frente a dosis crecientes de fenilefrina, observada en segmentos aórticos tratados con CCN2(IV) (50 ng/ml; 60 min.) y en ausencia o presencia de Apocinina (0,3 mM) o ML-171 (1 μ M). Los datos se expresan como la media \pm EEM de 4-8 experimentos independientes frente a la situación control en cada caso. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. Control.

Para evaluar la contribución del endotelio a las respuestas contráctiles aórticas observadas en el tratamiento con CCN2(IV) *ex vivo*, se realizó una medida de la contracción vascular en segmentos aórticos desprovistos de endotelio. Los resultados mostraron que la retirada de la capa endotelial aumentaba la respuesta contráctil a fenilefrina en comparación con los segmentos con la capa endotelial intacta y que, además, no se observaba un incremento mayor de la contracción en los segmentos desprovistos de endotelio y tratados con CCN2(IV) (Figura 25). Estos datos sugieren que un mediador potencial derivado de la capa endotelial, probablemente el O_2^- , está involucrado en los efectos sobre la función vascular observados en el tratamiento con CCN2(IV).

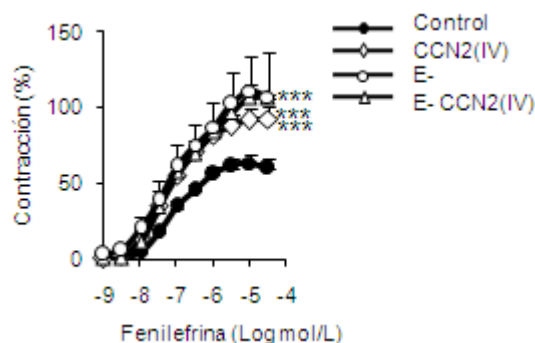


Figura 25. Evaluación de la respuesta contráctil vascular en aortas de ratón *ex vivo*. La gráfica muestra la respuesta contráctil vascular, frente a dosis crecientes de fenilefrina, observada en segmentos aórticos tratados con CCN2(IV) (50 ng/ml; 60 min.) en presencia o ausencia (E-) de endotelio. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 4-8 experimentos independientes frente a la situación control. ***p < 0,001 vs. Control.

3.2. CCN2(IV) generó disfunción endotelial *in vivo*

Teniendo en cuenta los datos obtenidos anteriormente y que una de las respuestas más tempranas ante el daño vascular es la disfunción endotelial (Savoia y Schiffrin, 2007), se quiso evaluar si existían diferencias en la función endotelial entre las aortas de los ratones tratados con CCN2(IV) y las aortas de los controles. De este modo, se montaron las aortas en un miógrafo de alambres, se contrajeron con fenilefrina y posteriormente se incubaron con concentraciones crecientes de Ach para evaluar la relajación aórtica dependiente de endotelio. Este estudio reflejó que había una menor relajación inducida por Ach en las aortas de los ratones tratados con CCN2(IV) en comparación con las aortas de los controles (Figura 26), demostrando por tanto que CCN2(IV) produce cambios en la función endotelial de aortas de ratón *in vivo*.

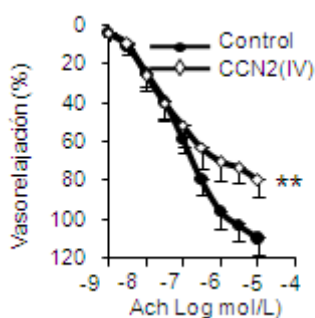


Figura 26. Estudio de la relajación vascular en aorta. La gráfica muestra el porcentaje de vaso-relajación de las aortas, ante concentraciones crecientes de Ach, en el grupo de ratones tratado con CCN2(IV) (2,5 ng/g; 24 horas) y en el grupo control. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 8-10 animales por grupo. **p < 0,01 vs. Control.

4. CCN2(IV) regula la respuesta proinflamatoria a nivel vascular

4.1. CCN2(IV) aumentó la expresión de genes proinflamatorios y activó la ruta NF- κ B en CMLVs de ratón en cultivo.

Para evaluar si CCN2(IV) podía mediar respuestas proinflamatorias en CMLVs de ratón en cultivo, se realizaron varios estudios donde se incubaron las células con CCN2(IV) durante 6 horas. El estudio por PCR a tiempo real reveló que existía un aumento significativo en los niveles de ARNm de diversos genes proinflamatorios, como la citoquina IL-6, la molécula de adhesión ICAM-1 y la quimioquina RANTES (Figura 27).

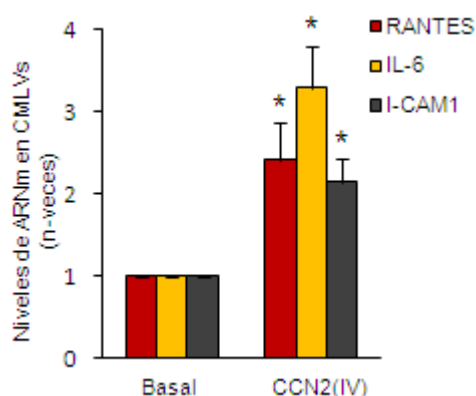


Figura 27. Evaluación de los niveles de ARNm de diversos factores en CMLVs. La gráfica muestra los niveles de ARNm, obtenidos mediante PCR a tiempo real, de RANTES, IL-6 e ICAM-1 en CMLVs tratadas con CCN2(IV) (50 ng/ml) durante 6 horas. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 5 experimentos independientes normalizados frente al basal. * $p < 0,05$ vs. Basal.

Posteriormente, se quiso determinar si la activación de la ruta NF- κ B podía estar mediando los efectos proinflamatorios observados en las CMLVs tras el tratamiento con CCN2(IV). Para ello, se diseñó un experimento en CMLVs en el que se incubaron las células a diferentes tiempos y dosis con CCN2(IV), y se evaluaron sus efectos sobre la ruta NF- κ B. Los datos reflejaron un aumento rápido en la activación de la ruta clásica de NF- κ B, el cual se determinó por *western blot* mediante un incremento en los niveles de fosforilación de la subunidad p65 del NF- κ B (Ser 536). Se pudo determinar que CCN2(IV) activa la ruta NF- κ B de manera dosis y tiempo dependiente, con un máximo de activación con 50 ng/ml y 60 minutos de tratamiento (Figura 28 A y B). La subunidad p65, una vez fosforilada, se transloca al núcleo celular y regula la transcripción génica de diversos factores (Sanz et al., 2010). En este sentido, mediante estudios por microscopía confocal, se pudo observar un aumento en los niveles de p65 nuclear en las CMLVs tratadas con CCN2(IV) a diferentes tiempos en comparación con las células en estado basal (Figura 28 C).

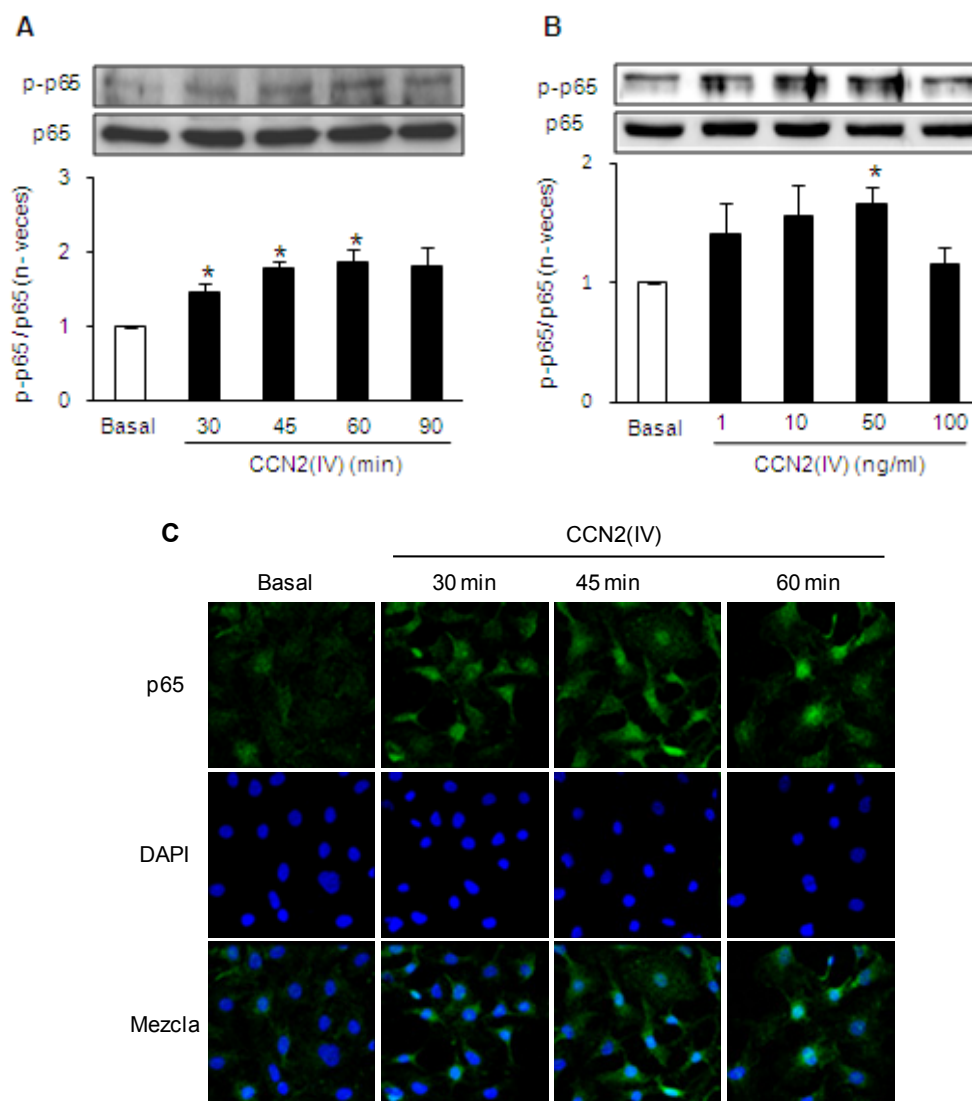


Figura 28. Determinación de los niveles de p-p65 y de la localización celular de p65 en CMLVs. Las gráficas muestran un *western blot* representativo y la cuantificación de los niveles de p-p65 en CMLVs tratadas con CCN2(IV) a diferentes tiempos (**A**) y dosis (**B**). Los datos se expresan como la media \pm EEM de 8 experimentos independientes normalizados frente al basal. *p < 0,05 vs. Basal. La figura **C** muestra microfotografías representativas de 4 experimentos independientes de microscopía confocal con la localización celular de p65 (verde) tras diferentes tiempos de tratamiento con CCN2(IV) (50 ng/ml).

4.2. CCN2(IV) reguló la expresión de genes proinflamatorios y activó la ruta NF- κ B en aorta de ratón *in vivo*, sin alterar los niveles de factores profibróticos.

El siguiente paso fue evaluar los efectos de la administración de CCN2(IV) sobre las respuestas inflamatoria y fibrótica *in vivo*. Para ello, se realizó un modelo experimental de administración i.p. de CCN2(IV) en ratones C57BL/6, y se estudió si producía algún efecto sobre estas respuestas en la aorta. 24 horas después de la administración de CCN2(IV), los estudios por PCR a tiempo real reflejaron un incremento en los niveles de ARNm de diversas citoquinas proinflamatorias, como IL-6 y TNF- α , de la molécula de adhesión ICAM-1, y de las quimioquinas MCP-1 y RANTES (Figura 29 A). Adicionalmente, mediante un ELISA, se pudo observar también

un incremento en los niveles proteicos de IL-6 en las aortas de los ratones tratados con CCN2(IV) frente a las aortas del grupo control (Figura 29 B). A continuación, se quiso evaluar si existían diferencias a nivel aórtico en los niveles de diversos factores profibróticos. A nivel génico se observó que no existían diferencias entre los diferentes grupos estudiados en los niveles de ARNm de dos factores implicados en procesos fibróticos, TGF- β y PAI-1, (Figura 29 A) mientras que un ELISA determinó que TGF- β tampoco presentaba cambios a nivel proteico (Figura 29 B).

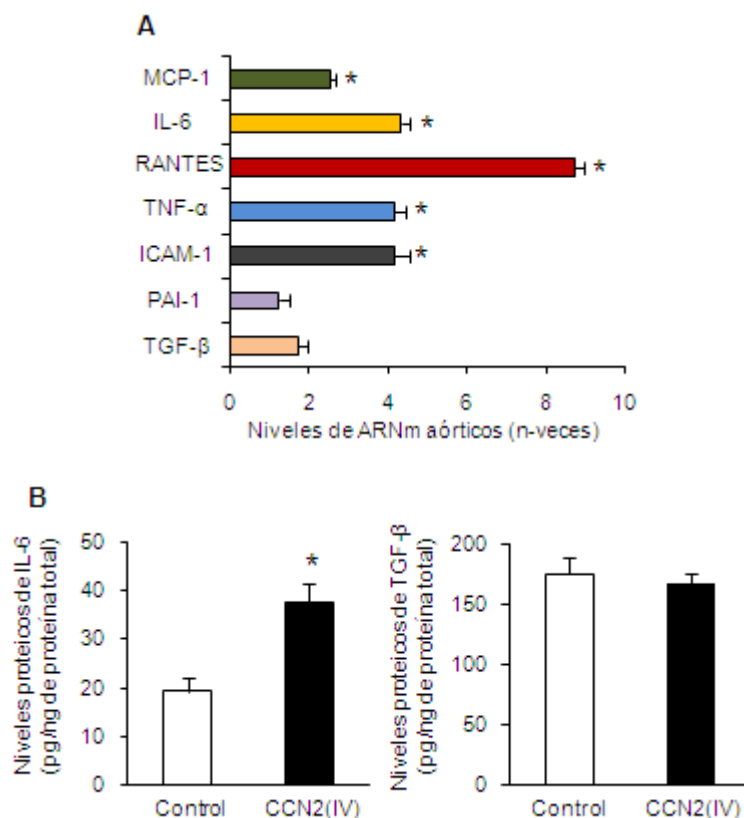


Figura 20. Evaluación de los niveles de ARNm de diversos factores y de los niveles proteicos de IL-6 y TGF- β en aorta de ratón. La gráfica **A** muestra los niveles de ARNm de diversos marcadores proinflamatorios y profibróticos, determinados mediante PCR a tiempo real, en aortas de ratones tratados con CCN2(IV) (2,5 ng/g; 24 horas). Los datos se expresan como las veces que incrementan los valores de cada gen en el grupo tratado con CCN2(IV) con respecto al grupo control, considerando este último como 1. * $p < 0,05$ vs. Control. **(B)** Muestra la concentración de IL-6 (izquierda) y de TGF- β (derecha) en las aortas de los ratones tratados con CCN2(IV) (2,5 ng/g; 24 horas) y de los ratones control. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 8-10 animales por grupo. * $p < 0,05$ vs. Control.

Para determinar si CCN2(IV) podía inducir un aumento en la deposición de colágeno en aorta de ratón, se realizó un estudio mediante la tinción de rojo sirio, el cual determinó que tampoco existían diferencias en los niveles de colágeno entre las aortas de los diferentes grupos estudiados (Figura 30).

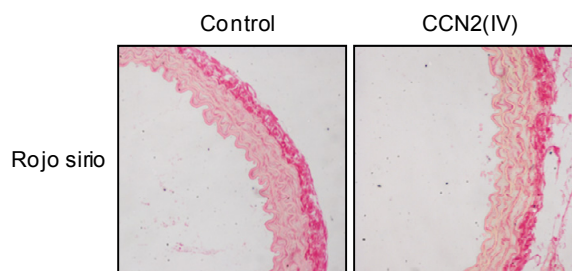


Figura 30. Evaluación de los niveles de colágeno en aorta mediante tinción de rojo sirio. Microfotografías representativas de la evaluación de los niveles de colágeno presentes en las aortas de los ratones tratados con CCN2(IV) (2,5 ng/g; 24 horas) y de los ratones control, n=8-10.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos *in vitro*, y el aumento en los niveles de factores proinflamatorios observado en las aortas de los ratones tratados con CCN2(IV), se quiso evaluar si CCN2(IV) podía regular también la ruta NF- κ B en aorta de ratón *in vivo*. Mediante técnicas de *western blot* e inmunohistoquímica, se observó que existía un aumento en los niveles de fosforilación de la subunidad p65 del NF- κ B en las aortas de los ratones tratados con CCN2(IV) en comparación con las aortas de los ratones control, lo que indica que CCN2(IV) induce también una activación de la ruta clásica de NF- κ B en aorta de ratón *in vivo* (Figura 31 A y B).

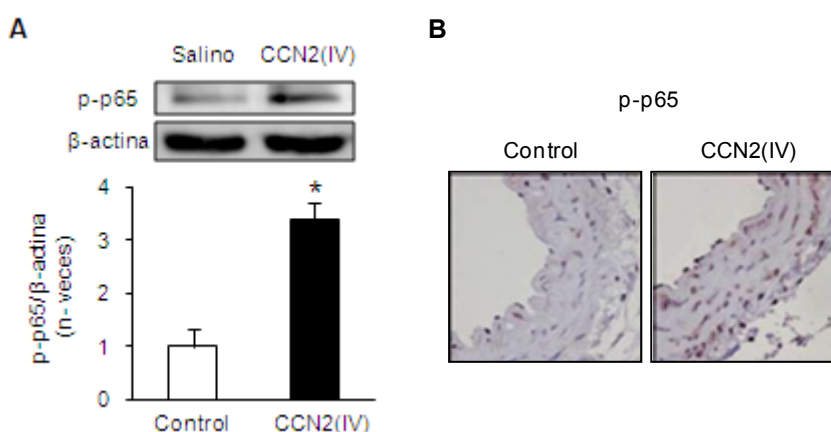


Figura 31. Evaluación de los niveles y localización de p-p65 en aorta de ratón. La figura A muestra un *western blot* representativo y la cuantificación de los niveles de p-p65, de las aortas de los ratones tratados con CCN2(IV) (2,5 ng/g; 24 horas). Los datos se expresan como la media \pm EEM de 8-10 animales por grupo normalizados frente al grupo control. *p < 0,05 vs. Control. (B) Microfotografías representativas de una IHQ de p-p65 en las aortas de cada grupo estudiado.

4.3. CCN2(IV) no aumentó el infiltrado inflamatorio a nivel vascular

Uno de los procesos más descritos en desórdenes inflamatorios vasculares crónicos, como la aterosclerosis, ha sido la aparición de un infiltrado de células inmunes en la pared vascular de la aorta. Debido a esto, se quiso evaluar si el tratamiento con CCN2(IV) producía un reclutamiento de células inmunes en la aorta. Para ello, se determinaron los porcentajes de células CD4⁺ (marcador de linfocitos T), CD45⁺ (marcador de leucocitos) y F4/80⁺ (marcador de monocitos/macrófagos) presentes en las aortas de los ratones tratados, o no, con CCN2(IV). Para complementar estos resultados, también se estudiaron los niveles de ARNm del marcador de linfocitos CD3. Mediante citometría de flujo, se pudo determinar que no existían diferencias en los niveles de ninguno de los marcadores estudiados, entre las aortas de los ratones tratados con CCN2(IV) y las de los ratones

control (Figura 32 A). Los estudios por PCR, reflejaron que tampoco existían cambios en los niveles de ARNm de CD3 entre los diferentes grupos estudiados (Figura 32 B). Estos resultados muestran que, a las 24 horas, CCN2(IV) no induce un reclutamiento de células inmunes hacia la pared vascular.

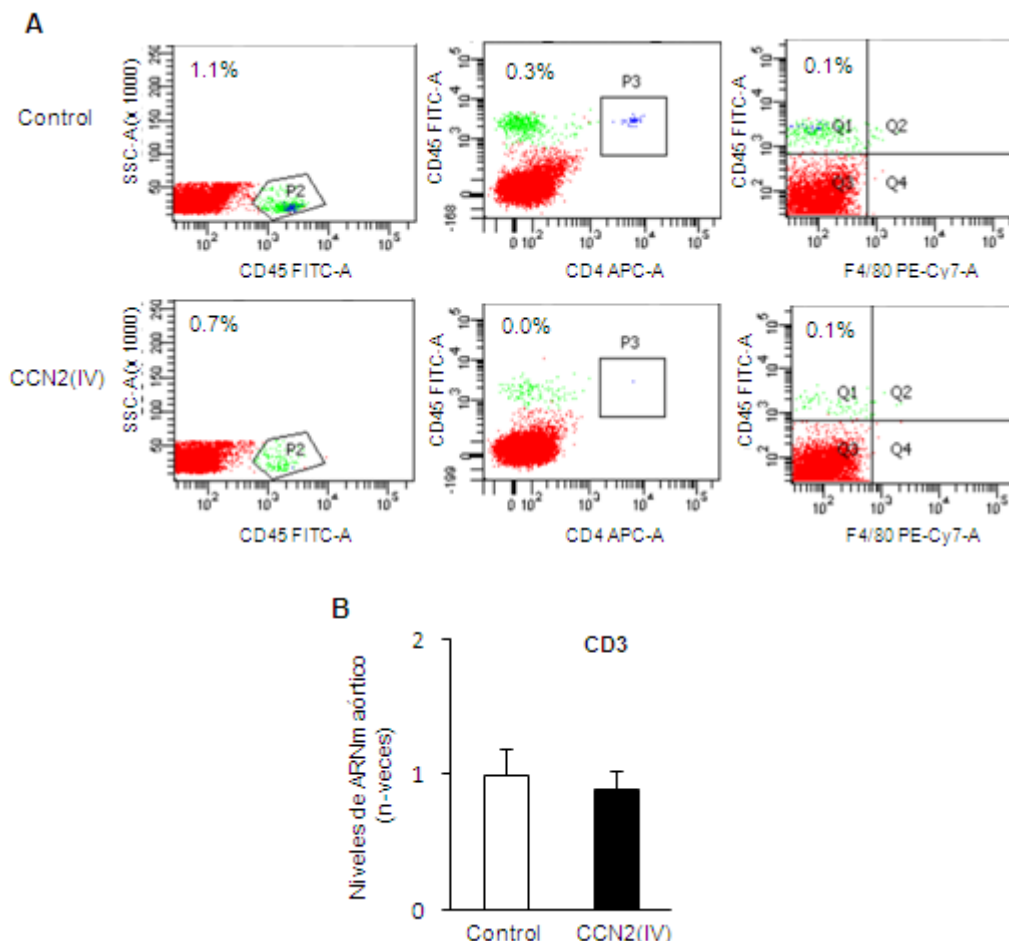


Figura 32. Evaluación de la presencia de células inmunes en la aorta. (A) Imagen representativa que muestra los niveles de células CD4⁺, CD45⁺ y F4/80⁺, determinados mediante citometría de flujo, presentes en la aorta de un ratón tratado con CCN2(IV) (2,5 ng/g de peso; 24 horas) y en la de un ratón control. Los datos se expresan como % de células marcadas frente al total. **(B)** La gráfica muestra los niveles de ARNm de CD3, determinados mediante PCR a tiempo real. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 8-10 animales por grupo normalizados frente al grupo control. *p < 0,05 vs. Control.

5. CCN2(IV) activa la ruta NF- κ B y regula genes proinflamatorios a nivel vascular, mediante procesos redox.

5.1. CCN2(IV) reguló la activación de la ruta NF- κ B y de genes proinflamatorios en CMLVs de ratón mediante procesos redox.

Una vez observados los efectos del CCN2(IV) sobre los procesos redox y la respuesta proinflamatoria en CMLVs, se quiso evaluar si existía una relación directa entre ambas rutas en respuesta al CCN2(IV). En primer lugar se realizó un estudio tratando las CMLVs de manera conjunta con CCN2(IV) y con diferentes inhibidores farmacológicos administrados 60 min antes del tratamiento con CCN2(IV). Por un lado se utilizaron inhibidores de la ruta de NF- κ B (Parthenolide y

BAY 11-7082), y por otro se utilizó un antioxidante (Apocinina) o un inhibidor selectivo de la enzima Nox1 (ML-171). Los resultados obtenidos demostraron que el pretratamiento de las CMLVs, con cualquiera de los fármacos estudiados, inhibía el incremento en los niveles de fosforilación de la subunidad p65 (Figura 33 A y B) o su translocación al núcleo (Figura 33 C), observados en las CMLVs tratadas solo con CCN2(IV).

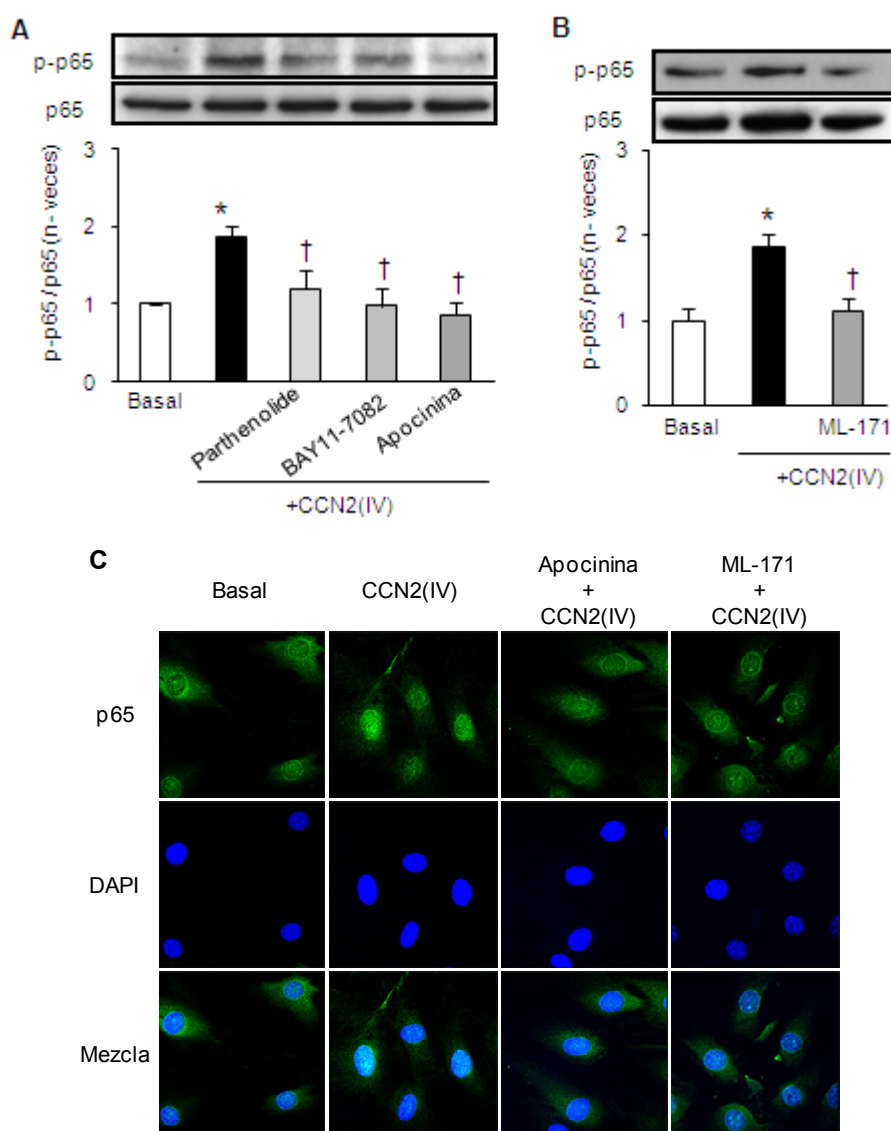


Figura 33. Determinación de los niveles de p-p65 y de la localización celular de p65 en CMLVs de ratón. Las gráficas muestran un *western blot* representativo y la cuantificación de los niveles de p-p65 en CMLVs tratadas solo con CCN2(IV) (50 ng/ml; 60 min.) o junto con parthenolide (1 μ M), BAY 11-7082 (1 μ M), Apocinina (0,3 mM) (**A**), o ML-171 (1 μ M) (**B**). Los datos se expresan como la media \pm EEM de 4-8 experimentos independientes normalizados frente al basal. * $p < 0,05$ vs. Basal; † $p < 0,05$ vs. CCN2(IV). La figura **C** muestra microfotografías representativas de 4 experimentos independientes de microscopía confocal con la localización celular de p65 (verde) en CMLVs, tras tratarlas solo con CCN2(IV) (50 ng/ml; 60 min.) o conjuntamente con Apocinina (0,3 mM) o ML-171 (1 μ M).

Se realizaron también estudios a nivel génico en los que se pudo determinar que el pretratamiento de las CMLVs con Parthenolide, BAY 11-7082 o Apocinina, revertía el incremento en los niveles de ARNm de los factores proinflamatorios RANTES, IL-6 y MCP-1, inducido por CCN2(IV) tras 6 horas de tratamiento (Figura 34).

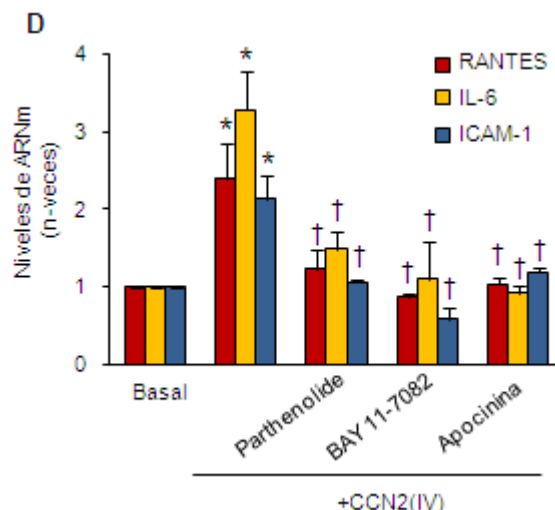


Figura 34. Evaluación de los niveles de ARNm de diversos factores en CMLVs de ratón. La gráfica muestra los niveles de ARNm, obtenidos mediante PCR a tiempo real, de RANTES, IL-6 e ICAM-1 en CMLVs de ratón tratadas solamente con CCN2(IV) (50 ng/ml) durante 6 horas, o conjuntamente con Parthenolide (1 μ M), BAY 11-7082 (1 μ M) o Apocinina (0,3 mM). Los datos se expresan como la media \pm EEM de 5 experimentos independientes normalizados frente al basal. * p < 0,05 vs. Basal; † p < 0,05 vs. CCN2(IV).

Estos datos sugerían que tanto la subida en los niveles de ARNm de los factores proinflamatorios como la activación de la ruta NF- κ B inducidos por CCN2(IV) en CMLVs, estaban mediadas por un aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$, el cual, a su vez, estaba inducido probablemente por la actividad de la enzima Nox1. Para determinar si la familia de las enzimas Nox, y particularmente Nox1, estaban mediando esta activación, se realizaron experimentos de silenciamiento en CMLVs en cultivo de una subunidad de membrana de las Nox, p22phox, y de Nox1, utilizando para ello un ARN de interferencia (ARNi) específico para cada una de ellas. Como se había hipotetizado, el silenciamiento, tanto de p22phox como de Nox1, revertió la activación de la ruta clásica de NF- κ B inducida por CCN2(IV) en las CMLVs, mientras que en las células transfectadas con el ARNi control esta ruta permanecía activada (Figura 35 A, B y C).

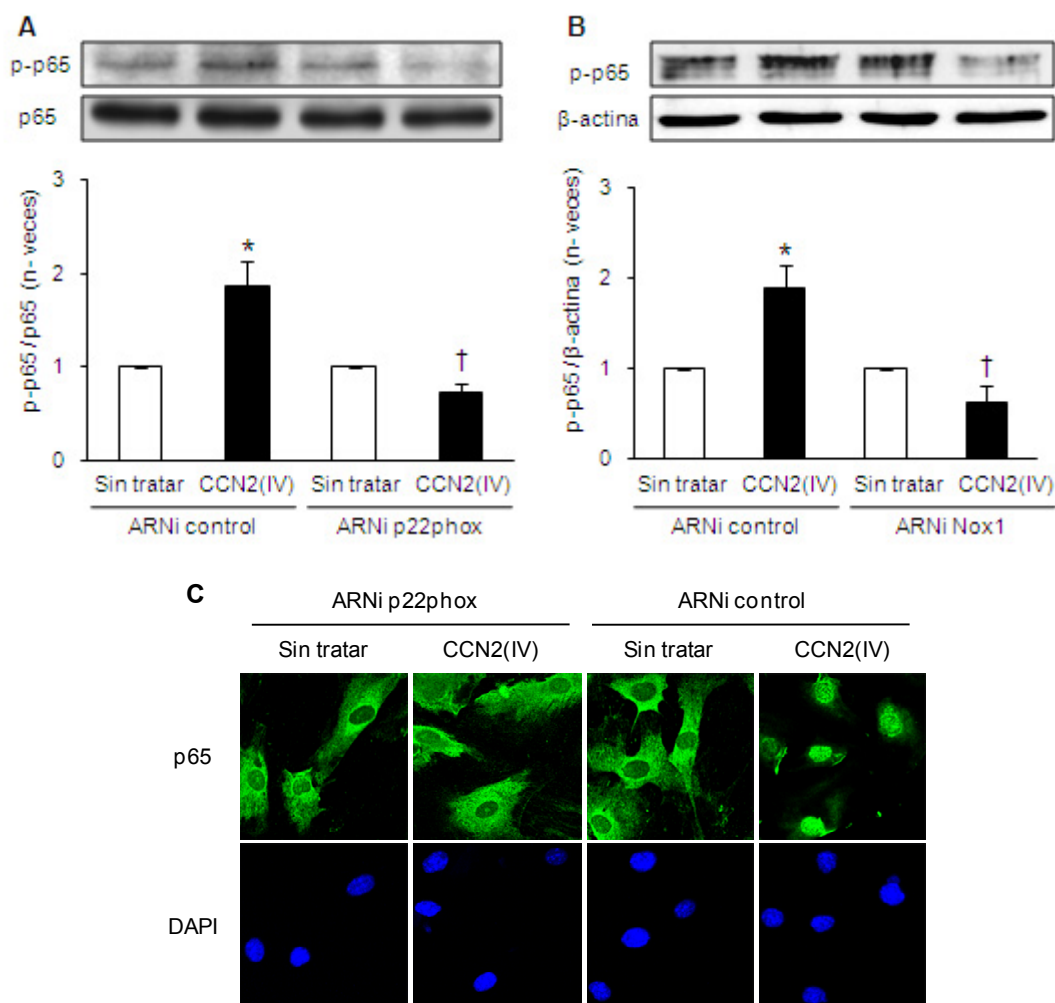


Figura 35. Determinación de los niveles de p-p65 y de la localización celular de p65 en CMLVs de ratón. Las gráficas muestran un *western blot* representativo y la cuantificación de los niveles de p-p65 en CMLVs tratadas con CCN2(IV) (50 ng/ml; 60 min.) y silenciadas, o no, para p22phox (5 ng/ml) (**A**) y Nox1 (5 ng/ml) (**B**). En ambos casos se utilizó como control de la técnica un ARNi control (5 ng/ml). Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados frente a las células sin tratar. * $p < 0,05$ vs. Sin tratar; † $p < 0,05$ vs. CCN2(IV). La figura **C** muestra microfotografías representativas de 3 experimentos independientes de microscopía confocal con la localización celular de p65 (verde) tras el tratamiento con CCN2(IV) (50 ng/ml; 60 min.) y el silenciamiento, o no, de p22phox.

5.2. CCN2(IV) reguló la activación de la ruta NF- κ B y de genes proinflamatorios en aorta de ratón *in vivo* mediante procesos redox.

Para determinar si la relación directa observada entre los procesos redox y la respuesta proinflamatoria inducida por CCN2(IV) en CMLVs tenía también lugar *in vivo*, se seleccionó un grupo de ratones al que se le administró, junto con el CCN2(IV), un inhibidor de la ruta NF- κ B (Parthenolide) o un antioxidante (Apocinina). Los estudios inmunohistoquímicos y de PCR a tiempo real, reflejaron una bajada en la activación de la ruta NF- κ B y en los niveles de genes proinflamatorios respectivamente, en las aortas de los ratones tratados conjuntamente con parthenolide o con Apocinina en comparación con las aortas del grupo tratado solamente con CCN2(IV). Los resultados observados en el grupo tratado con Parthenolide sirvieron para

demostrar que la activación de la ruta NF- κ B inducida por CCN2(IV) en aorta era la que estaba regulando la activación de genes proinflamatorios. Del mismo modo, los datos obtenidos en el grupo tratado con Apocinina mostraron que tanto la activación de la ruta NF- κ B, como el aumento en la síntesis de genes proinflamatorios, estaban condicionados a la activación previa de procesos redox por parte de CCN2(IV) (Figura 36 A y B).

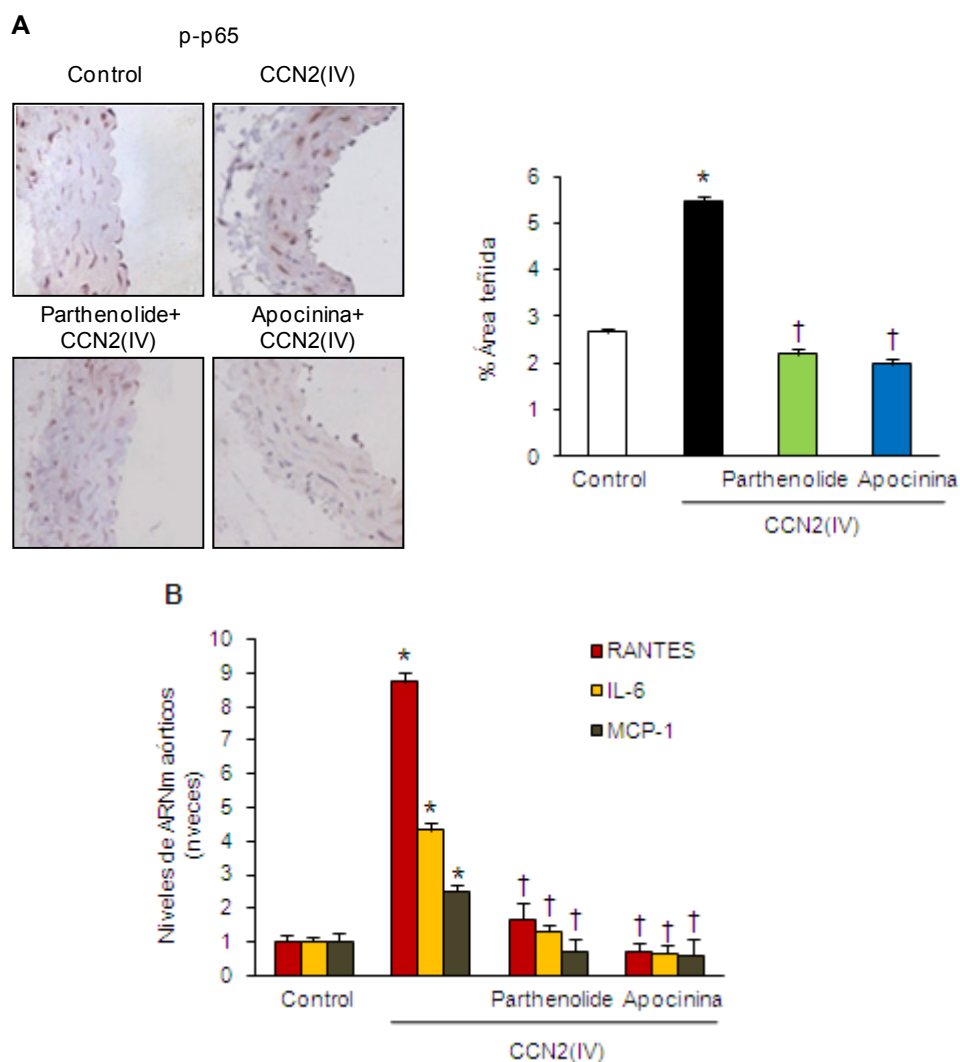


Figura 36. Evaluación de los niveles de p-p65 y del ARNm de diversos factores en aorta de ratón. (A) El panel izquierdo muestra microfotografías representativas de una IHQ de p-p65 realizada en las aortas de cada uno de los grupos estudiados: tratados con CCN2(IV) (2,5 ng/g); o tratados conjuntamente con Apocinina (50 mg/Kg) o parthenolide (3,5 mg/Kg). La grafica del panel derecho representa la cuantificación de la IHQ para determinar los niveles de p-p65 en las aortas de cada grupo estudiado. **(B)** La gráfica muestra los niveles de ARNm de RANTES, IL-6 y MCP-1, determinados mediante PCR a tiempo real, en las aortas de los diferentes grupos estudiados. Todos los datos se expresan como la media \pm EEM de 8-10 animales por grupo normalizados frente al grupo control. *p < 0,05 vs. Control; † p < 0,05 vs. CCN2(IV).

6. El silenciamiento génico de Nox1 *in vivo* bloqueó las respuestas vasculares inducidas por CCN2(IV).

Teniendo en cuenta los datos obtenidos anteriormente, se quiso determinar si la enzima Nox1 estaba mediando las respuestas vasculares inducidas por CCN2(IV) *in vivo*. Para inhibir la expresión del gen, un grupo de ratones fue tratado con un Oligo-Morfolino frente a Nox1 recibiendo dos inyecciones retrorbitales, una aplicada 24 horas antes y otra el mismo día de la administración del CCN2(IV). La efectividad del tratamiento con el Oligo-Morfolino se confirmó evaluando los niveles de Nox1 mediante *western blot*, en aorta y en riñón. En ambos tejidos se comprobó que los niveles de Nox1 se encontraban prácticamente inhibidos en el grupo tratado con el Oligo-Morfolino en comparación con los mismos tejidos del grupo control (Figura 37 A y B).

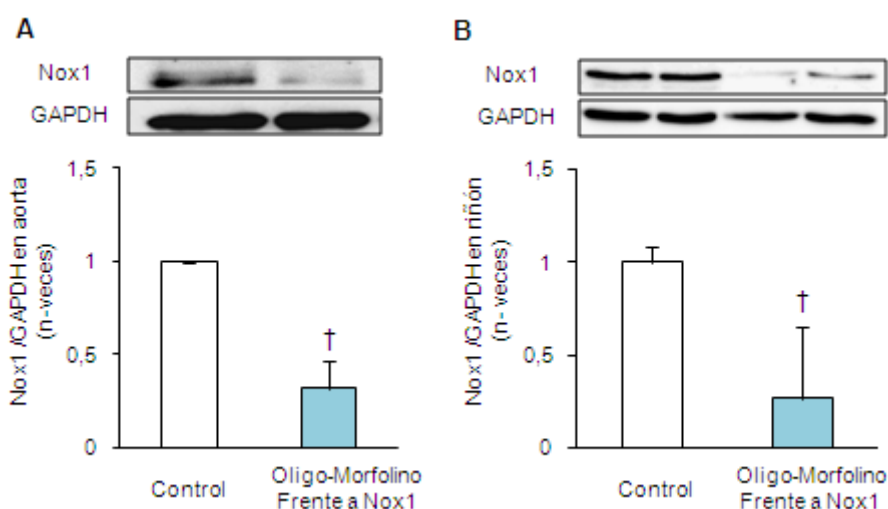


Figura 37. Determinación de los niveles de Nox1 en aorta y riñón de ratón. Se muestra un *western blot* representativo y la cuantificación de los niveles de Nox1 en aorta (A) y riñón (B) de ratones tratados con un Oligo-Morfolino frente a Nox1 (10 mg/kg). Los datos se expresan como la media \pm EEM de 8-10 animales por grupo normalizados frente al grupo control. † $p < 0,05$ vs. Control.

El análisis inmunohistoquímico de las aortas de este modelo, reflejó una bajada en los niveles de p-p65 en las aortas de los ratones cotratados con el Oligo-Morfolino frente a Nox1 en comparación con las aortas de los ratones tratados solo con CCN2(IV) (Figura 38 A). Además, en las aortas del grupo tratado con CCN2(IV), se detectó mediante *western blot*, un aumento en los niveles citosólicos del factor I κ B α fosforilado, indicando una activación de la ruta NF- κ B, mientras que en las aortas del grupo pretratado con el Oligo-Morfolino frente a Nox1, los niveles de I κ B α fosforilado se encontraban en valores similares a los observados en las aortas control (Figura 38 B). Estos datos indicaban que la activación de la ruta NF- κ B inducida por CCN2(IV) estaba mediada por la activación de Nox1.

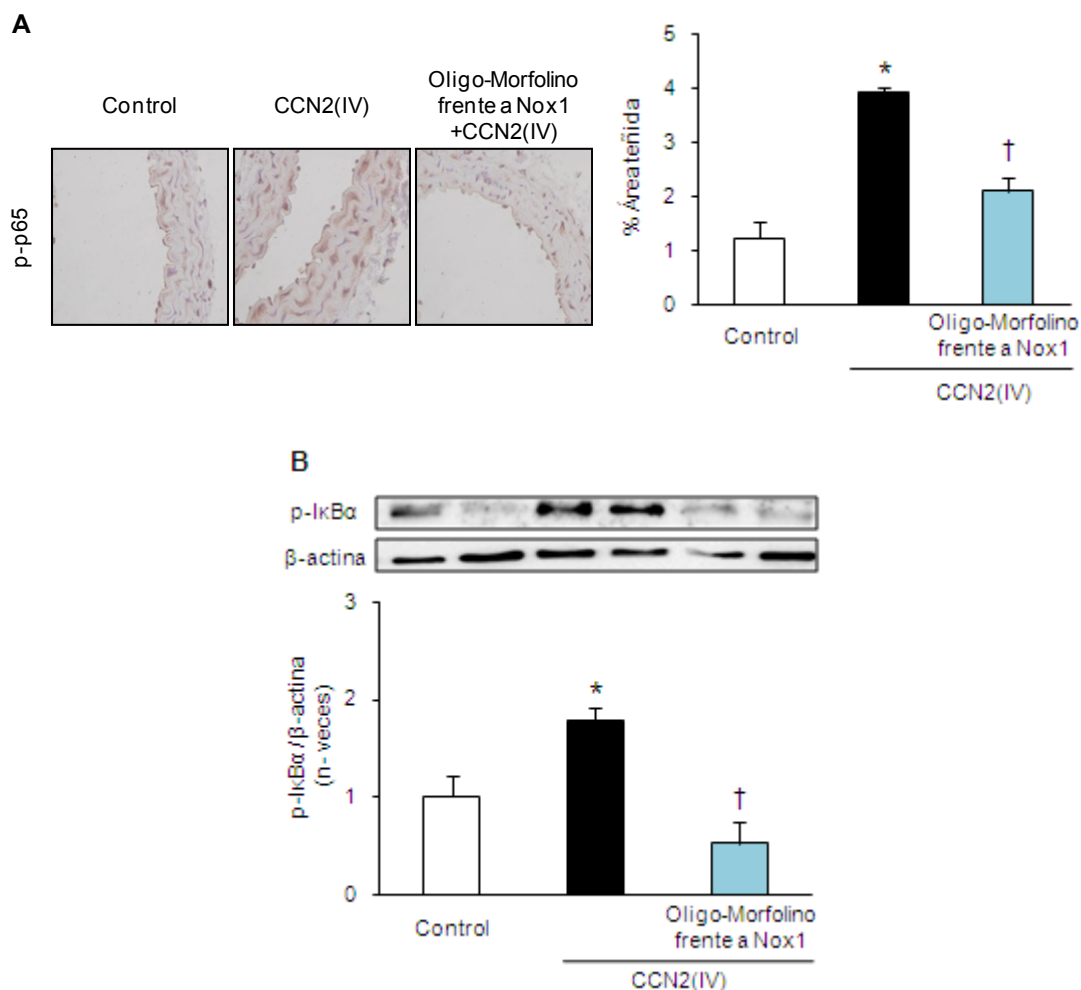


Figura 38. Evaluación de los niveles de p-p65 y del p-IκBα en aorta de ratón. (A) El panel de la derecha muestra microfotografías representativas de una IHQ de p-p65, realizada en las aortas de cada uno de los grupos estudiados: tratados solo con CCN2(IV) (2,5 ng/g); o conjuntamente con un Oligo-Morfolino frente a Nox1 (10 mg/kg). La grafica del panel derecho representa la cuantificación de la IHQ para determinar los niveles de p-p65 en las aortas de cada grupo estudiado. (B) Muestra un *western blot* representativo y la cuantificación de los niveles de p-IκBα en las aortas de los ratones tratados con CCN2(IV) (2,5 ng/g), o tratados conjuntamente con un Oligo-Morfolino frente a Nox1 (10 mg/kg). Los datos se expresan como la media \pm EEM de 8-10 animales por grupo normalizados frente al grupo control. *p <0,05 vs. Control; † p<0,05 vs. CCN2(IV).

Los estudios a nivel génico reflejaron que en las aortas de los ratones tratados con el Oligo-Morfolino frente a Nox1, los niveles aórticos de ARNm de los genes proinflamatorios inducidos por CCN2(IV), RANTES, IL-6 y MCP-1, se encontraban en valores similares a los obtenidos en las aortas del grupo control (Figura 39), demostrando por tanto, que el aumento en los niveles de estos genes inducido por CCN2(IV) está mediado por la actividad de Nox1.

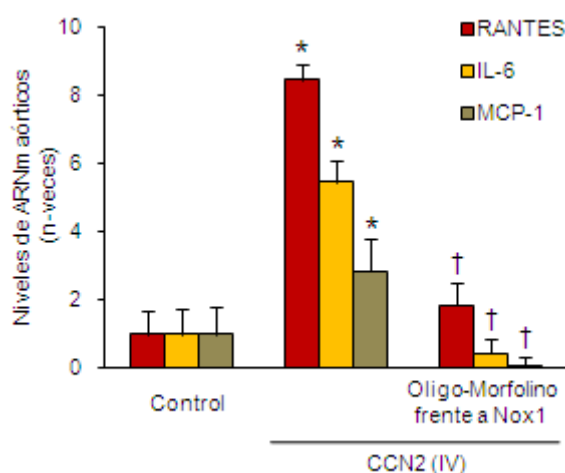


Figura 39. Evaluación de los niveles de ARNm de diversos factores en aorta de ratón. La gráfica muestra los niveles de ARNm de RANTES, IL-6 y MCP-1, determinados mediante PCR a tiempo real, en las aortas de los diferentes grupos estudiados: tratados solo CCN2(IV) (2,5 ng/g); o conjuntamente con un Oligo-Morfolino frente a Nox1 (10 mg/kg). Los datos se expresan como la media \pm EEM de 8-10 animales por grupo normalizados frente al grupo control. *p <0,05 vs. Control; † p <0,05 vs. CCN2(IV).

El estudio de los niveles de producción de $O_2^{\cdot -}$ aórticos en este modelo experimental, determinados con el análisis por HPLC de la oxidación del DHE, refleja una bajada en la producción de $O_2^{\cdot -}$ en las aortas de los ratones tratados conjuntamente con el Oligo-Morfolino frente a Nox1 y CCN2(IV), en comparación con los niveles observados en las aortas del grupo tratado solo con CCN2(IV) (Figura 40).

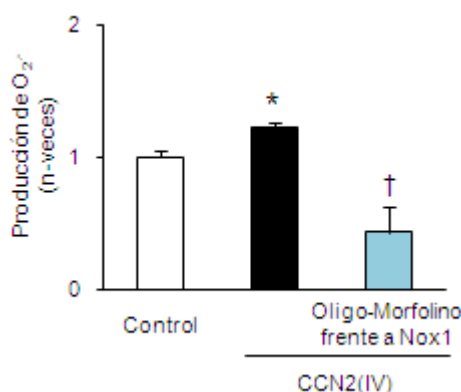


Figura 40. Cuantificación de los niveles $O_2^{\cdot -}$ en aorta de ratón por HPLC. La gráfica muestra la cuantificación de los niveles de $O_2^{\cdot -}$ en las aortas de los diferentes grupos estudiados: tratados solo con CCN2(IV) (2,5 ng/g); o conjuntamente con un Oligo-Morfolino frente a Nox1 (10 mg/kg). Los datos se expresan como la media \pm EEM de 8-10 animales por grupo normalizados frente al grupo control. *p <0,05 vs. Control; † p <0,05 vs. CCN2(IV).

En este sentido también se observó que en las aortas del grupo tratado con el Oligo-Morfolino frente a Nox1, otras respuestas vasculares que se habían encontrado inducidas por el tratamiento con CCN2(IV), como son la nitrosilación proteica (determinada por los niveles de 3-nitrotirosina) (Figura 41) y la disfunción endotelial (Tabla 5, ver página 65), se encontraban también disminuidas, confirmando el importante papel que juega Nox1 en las respuestas vasculares mediadas por CCN2(IV) en aorta de ratón.

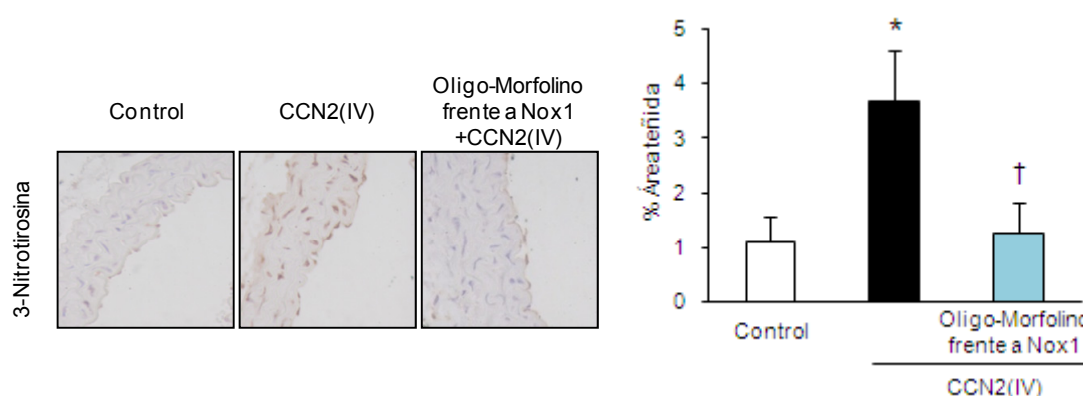


Figura 41. Cuantificación de los niveles de 3-Nitrotirosina en aorta de ratón. En la parte izquierda se observan microfotografías representativas de una tinción IHQ para detectar 3-Nitrotirosina en las aortas de los diferentes grupos estudiados: tratados solo con CCN2(IV) (2,5 ng/g; 24 horas) o conjuntamente con un Oligo-Morfolino frente a Nox1 (10 mg/kg). En la parte derecha se muestra la cuantificación de los niveles de 3-Nitrotirosina en las aortas de los diferentes grupos. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 8-10 animales por grupo normalizados frente al grupo control. *p <0,05 vs. Control; † p <0,05 vs. CCN2(IV).

7. CCN2(IV) reguló respuestas vasculares mediante la activación del receptor de EGF.

Una vez comprobada la interconexión de los procesos redox e inflamatorios regulados por CCN2(IV), se quiso determinar el receptor a través del cual CCN2(IV) estaba generando estas respuestas. Recientemente se ha descrito a CCN2 como un nuevo ligando del EGFR tanto en estudios *in vitro* como en riñones de ratón (Rayego et al., 2013; Chang et al., 2013), por lo que se quiso evaluar si este receptor podía estar mediando las respuestas vasculares inducidas por CCN2(IV) que se habían observado.

En primer lugar se comprobó, mediante *western blot*, que el tratamiento con CCN2(IV) en CMLVs inducía una activación temprana del EGFR a los 10 y 15 minutos, reflejada por un incremento en los niveles de la proteína fosforilada (p-EGFR) (Figura 42).

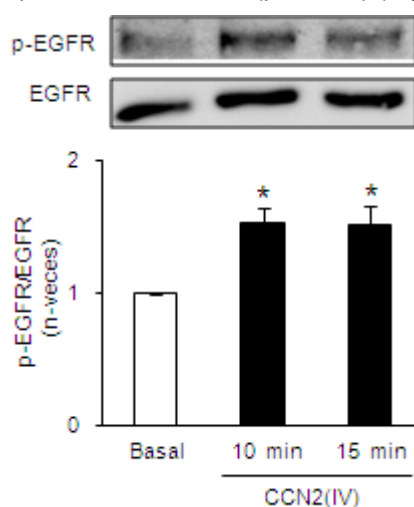


Figura 42. Determinación de los niveles de p-EGFR en CMLVs de ratón. Se muestra un *western blot* representativo y la cuantificación de los niveles de p-EGFR en CMLVs tratadas con CCN2(IV) (50 ng/ml) durante diferentes tiempos. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 3-5 experimentos independientes normalizados frente al basal. * p <0,05 vs. Basal.

A continuación, se quiso evaluar si la activación de este receptor estaba mediando las respuestas vasculares inducidas por CCN2(IV) *in vivo*, para lo cual se utilizó un inhibidor farmacológico del EGFR (Erlotinib). Para realizar este estudio, un grupo de ratones fue tratado con Erlotinib mediante 2 inyecciones intraperitoneales, una realizada el 24 horas antes y otra el mismo día de la administración del CCN2(IV). Los estudios inmunohistoquímicos reflejaron una inhibición, tanto en la activación del EGFR como en la activación de la ruta clásica de NF- κ B, en las aortas de los ratones tratados con Erlotinib frente a los ratones tratados solo con CCN2(IV) (Figura 43).

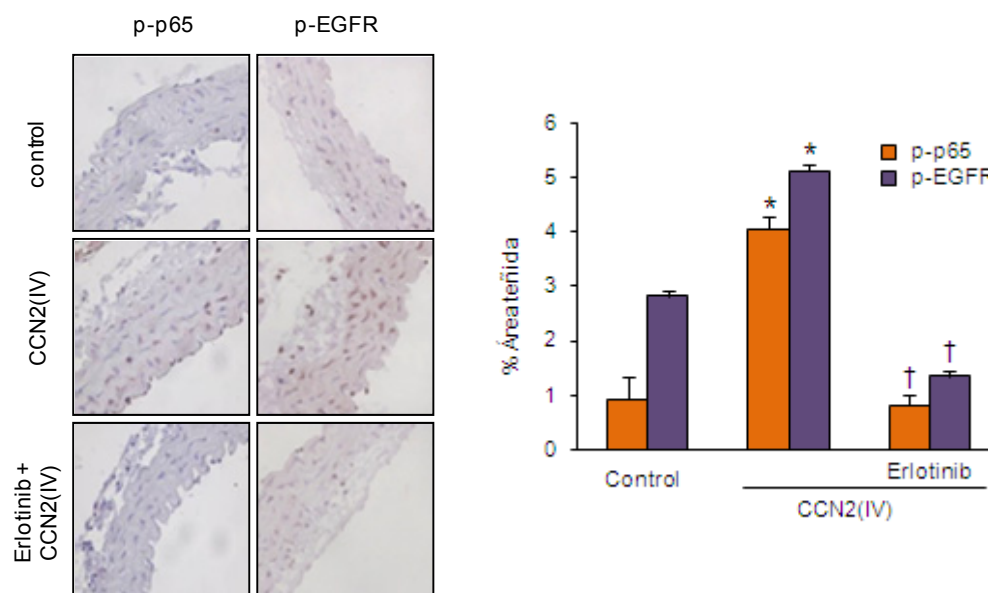


Figura 43. Determinación de los niveles de p-p65 y de p-EGFR en aorta de ratón. En la parte izquierda se observan microfotografías representativas de una tinción IHQ para detectar p-p65 y p-EGFR en los diferentes grupos estudiados: tratados solo con CCN2(IV) (2,5 ng/g; 24 horas) o conjuntamente con Erlotinib (40 mg/kg). En la parte derecha se muestra la cuantificación de los niveles de p-p65 y de p-EGFR en las aortas de los diferentes grupos estudiados. Los datos se expresan como la media \pm EEM de 8-10 animales por grupo normalizados frente al grupo control. *p < 0,05 vs. Control; †p < 0,05 vs. CCN2(IV).

El estudio de los niveles de producción de $O_2^{\cdot -}$ aórticos en este modelo experimental, determinados con el análisis por HPLC de la oxidación del DHE, mostró una bajada en los niveles de $O_2^{\cdot -}$ en las aortas de los ratones tratados con Erlotinib en comparación con los niveles observados en las aortas de los ratones tratados solo con CCN2(IV) (Figura 44).

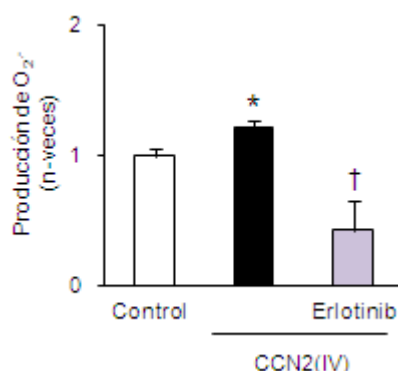


Figura 44. Evaluación de los niveles de O_2^- en aorta de ratón. La gráfica muestra la cuantificación de los niveles de O_2^- , obtenida mediante HPLC, en las aortas de los diferentes grupos estudiados: tratados solo con CCN2(IV) (2,5 ng/g; 24 horas); o conjuntamente con Erlotinib (40 mg/kg). Los datos se expresan como la media \pm EEM de 8-10 animales por grupo normalizados frente al grupo control. *p < 0,05 vs. Control; † p < 0,05 vs. CCN2(IV).

Los estudios a nivel génico reflejaron una inhibición en los niveles de ARNm de RANTES, IL-6 y MCP-1 en las aortas de los ratones tratados con Erlotinib en comparación con las aortas de los ratones tratados únicamente con CCN2(IV) (Figura 45).

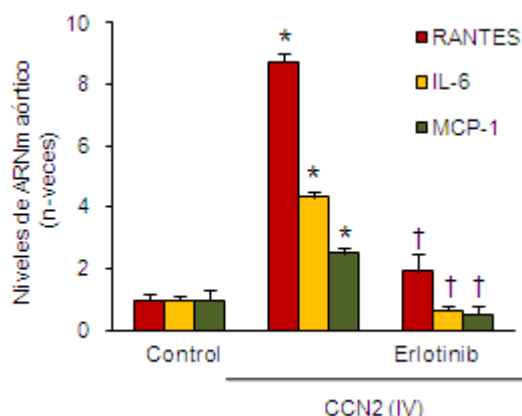


Figura 45. Evaluación de los niveles de ARNm de diversos factores en aorta de ratón. La gráfica representa los niveles de ARNm de RANTES, IL-6 y MCP-1, determinados mediante PCR a tiempo real, detectados en las aortas de los diferentes grupos estudiados: tratados solo con CCN2(IV) (2,5 ng/g; 24 horas); o conjuntamente con Erlotinib (40 mg/kg). Todos los datos se expresan como la media \pm EEM de 8-10 animales por grupo normalizados frente al grupo control. *p < 0,05 vs. Control; † p < 0,05 vs. CCN2(IV).

Por último, se evaluó la función endotelial aórtica y se comprobó que el tratamiento con Erlotinib inhibió significativamente la disfunción endotelial generada por el tratamiento con CCN2(IV) (Tabla 5).

<u>Aortas de:</u>	<u>% de relajación frente ACh</u>
Ratones tratados con salino	118,8 ± 7,3
Ratones tratados con CCN2(IV)	78,5 ± 8,1*
Ratones tratados con Oligo-Morfolino frente Nox1 + CCN2(IV)	131,7 ± 11,6 †
Ratones tratados con Erlotinib + CCN2(IV)	127,7 ± 19,6 †

Tabla 5. Estudio de la relajación vascular en aorta. La tabla muestra los porcentajes de relajación obtenidos en un estudio de vaso-relajación, ante concentraciones crecientes de ACh, de las aortas de los diferentes grupos estudiados: CCN2(IV) (2,5 ng/g); Oligo-Morfolino frente a Nox1 (10 mg/kg); Erlotinib (40 mg/kg). Los datos se expresan como la media ± EEM de 6 animales por grupo. *p <0,05 vs. Control; † p<0,05 vs. CCN2(IV).

Discusión

DISCUSIÓN

Existen genes implicados en el desarrollo embrionario que, aunque se encuentran silentes en adultos normales, pueden reexpresarse en determinadas patologías. Este es el caso de CCN2, el cual tiene un papel muy importante en el desarrollo embrionario. Sin embargo, su reexpresión en condiciones patológicas se ha asociado tradicionalmente con los procesos fibróticos presentes en numerosas patologías, ya que se ha localizado principalmente en áreas con acumulación de MEC (Leask, 2011). Paralelamente a la visión tradicional de CCN2 como mediador profibrótico, están apareciendo recientemente trabajos donde se sugiere que la presencia de CCN2 podría estar también involucrada en respuestas inflamatorias (Kular et al., 2011). Los resultados obtenidos en el presente trabajo han demostrado que CCN2(IV), tanto en células en cultivo como en aorta de ratón, regula respuestas a nivel vascular a través del EGFR, incluyendo aumento en la producción de ROS, inducción de disfunción endotelial, activación de la ruta NF- κ B y sobreexpresión de factores proinflamatorios. Estos resultados contribuyen a expandir la idea de que CCN2, aparte de contribuir y mediar procesos fibróticos, puede estar regulando repuestas proinflamatorias a nivel vascular.

1. ROS y CCN2 en el daño vascular inducido por Ang II en aorta de ratón.

En numerosas enfermedades humanas, como la aterosclerosis, la diabetes o la hipertrofia cardíaca, así como en diversos modelos experimentales de daño vascular, se ha descrito que el aumento en la producción de ROS es uno de los mecanismos claves en su aparición y desarrollo. Al mismo tiempo, otro de los factores cuyo aumento se ha relacionado con la patogenia de algunas de estas enfermedades y modelos experimentales, ha sido el CCN2 (de Winter et al., 2008; Oemar et al., 1997; Ponticos, 2013; Ruperez et al., 2003; Van Geest et al., 2014). En este sentido, se ha descrito que en pacientes con aneurisma torácico aórtico existe un aumento local tanto en la producción de ROS como en los niveles de CCN2, los cuales, mediante la inducción de un cambio fenotípico de las CMLVs, están directamente relacionados con la degradación de la capa media del vaso (Branchetti et al., 2013). Siguiendo la línea de estos estudios, el presente trabajo ha demostrado que tras siete días de administración sistémica de Ang II en ratones, las aortas presentaban niveles elevados tanto de CCN2 como de $O_2^{\cdot-}$, y que ambos se localizaban principalmente en las CMLVs. Estos datos indicaban que podría existir una relación directa entre la sobreexpresión de CCN2 y el aumento de ROS, y sugirieron la posibilidad de que la contribución de CCN2 al desarrollo del daño vascular inducido por Ang II estuviera mediada por la producción de ROS. Para poder determinar si CCN2 podía actuar realmente como un factor activador de respuestas redox, se realizaron estudios adicionales que confirmaran esta hipótesis.

2. CCN2(IV) aumenta la producción de $O_2^{\cdot-}$ vía Nox1.

Aunque se ha descrito que CCN2 es un gen regulado por procesos redox (Liu et al., 2010; Park et al., 2001; Ruperez et al., 2003), existen todavía pocos estudios que describan la relación directa entre las proteínas de la familia CCN y el estrés oxidativo. En lo que respecta a las CMLVs, se ha demostrado que diferentes antioxidantes, entre los que se encuentran inhibidores de enzimas Nox y secuestradores de $O_2^{\cdot-}$, son capaces de inhibir la sobreexpresión de CCN2 inducida por diferentes factores relacionados con el daño vascular, como Ang II o ET-1 (Ruiz-Ortega et al., 2007), lo que indica que la síntesis de CCN2 inducida por dichos factores está mediada por un aumento en la producción de ROS. Se ha comprobado también que, tanto el H_2O_2 como otros tipos de ROS, pueden inducir directamente la expresión de CCN2 en células epiteliales de cristalino humano (Park et al., 2001), sin producir efectos secundarios en la producción o actividad de TGF- β .

Atendiendo a los miembros de la familia CCN, se han descrito diferentes relaciones con los ROS dependiendo del tipo celular. En este sentido, se ha descrito que en fibroblastos de piel humanos, CCN1, a través de un proceso regulado por su unión a integrinas y la activación de la proteína Rac1, da lugar a la producción de ROS mediante varios mecanismos que incluyen la intervención de la Lipoxigenasa 5, la esfingomielina fosfodiesterasa neutra y la mitocondria, de tal forma que en esta producción de ROS no participa la enzima Nox1 (Juric et al., 2009). Una vez generados, estos ROS producidos por CCN1, producen una sinergia con el ligando de FAS que contribuye a un aumento en la apoptosis inducida por dicho factor (Juric et al., 2009). Sin embargo, en células estrelladas hepáticas, se ha descrito que el proceso de inducción de ROS por CCN1 incluye también el mecanismo Rac1, pero en este caso sí que es necesaria la participación de Nox1 (Kim et al., 2013).

En el presente trabajo se ha demostrado que CCN2(IV), a través de la enzima Nox1, induce la producción de $O_2^{\cdot-}$ tanto en CMLVs en cultivo como en aorta de ratón. Mediante diferentes abordajes, como el tratamiento farmacológico con el inhibidor selectivo de Nox1, ML-171, o el silenciamiento génico de la propia Nox1 o de la subunidad p22phox, se ha comprobado que CCN2(IV) produce un aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ así como en la actividad NAD(P)H oxidasa en CMLVs en cultivo, y que la enzima a través de la cual realiza este proceso es Nox1. Además, en los experimentos realizados en aorta de ratón ex vivo, el uso de ML-171 también redujo los aumentos en la producción de $O_2^{\cdot-}$ y en la actividad NAD(P)H oxidasa generados por el tratamiento con CCN2(IV). Del mismo modo, utilizando el antioxidante Apocinina o un Oligo-Morfolino frente a Nox1, se ha podido determinar que la administración de CCN2(IV) produce igualmente un aumento en la síntesis de $O_2^{\cdot-}$ y en la actividad NAD(P)H oxidasa en aorta de ratón tras 24 horas de tratamiento, y que el mecanismo a través del cual produce estos cambios incluye a la enzima Nox1.

Los datos obtenidos han revelado que CCN2(IV) induce también un aumento en la producción de $O_2^{\cdot -}$ en CEs en cultivo, aunque en este caso sería necesario realizar experimentos futuros evaluando varios candidatos potenciales como la propia Nox1, Nox2, Nox4, la eNOS en estado desacoplado o la xantina oxidasa (Münzel et al., 2010, Van Buul et al., 2005), para poder determinar cuál de ellos estaría mediando este proceso.

3. CCN2(IV), vía Nox1, induce cambios en la respuesta contráctil vascular y genera disfunción endotelial.

Se ha descrito que la sobreexpresión de ROS participa activamente en las alteraciones del tono vascular asociadas a diversas enfermedades, como la hipertensión, la diabetes o la aterosclerosis (Briones y Touyz, 2010; Savoia y Schiffrin, 2007; Tousoulis et al., 2012). Este trabajo ha demostrado que la activación de la señalización redox por CCN2(IV) está ligada a efectos directos sobre la pared vascular, como son un aumento en la contracción inducida por fenilefrina o la inducción de disfunción endotelial observados en aorta, tanto en el modelo experimental de administración de CCN2(IV) como en los experimentos realizados en aorta *ex vivo*. El uso de ML-171 y Apocinina en los experimentos *ex vivo*, así como la administración sistémica de un Oligo-Morfolino frente a Nox1 o de la propia Apocinina, sirvieron para determinar que la producción de $O_2^{\cdot -}$ contribuye directamente a los cambios observados en la respuesta vascular y a la disfunción endotelial inducidos por CCN2(IV).

El mecanismo responsable de la disfunción endotelial causada por CCN2(IV), podría explicarse por la reacción entre el NO derivado de la i-NOS (enzima cuya expresión se ha visto aumentada también por el tratamiento con CCN2(IV)) y el aumento en la síntesis de $O_2^{\cdot -}$. La reacción que se produce entre ambos factores, NO y $O_2^{\cdot -}$, conduce a la generación de un potente agente prooxidante, el peroxinitrito, el cual se ha descrito que puede inducir disfunción endotelial en numerosas patologías, incluida la hipertensión, la diabetes, el shock séptico o la aterosclerosis (Pacher et al., 2007). Las acciones a través de las cuales el peroxinitrito puede dar lugar a una disfunción endotelial son variadas, ya que puede deberse tanto a sus acciones citotóxicas, como son el daño oxidativo en proteínas, lípidos o ADN, como a la capacidad que posee de inhibir la producción de mediadores de protección endoteliales, como la prostaciclina (Moncada y Higgs, 2006; Münzel et al., 2010). En este sentido, los datos obtenidos en el presente trabajo han reflejado que, mientras que en las aortas de los ratones tratados con CCN2(IV) existía un aumento en los niveles de 3-Nitrotirosina, la producción de NO se mantenía similar entre los grupos estudiados. Aunque este aumento en la producción de 3-Nitrotirosina y la ausencia de un aumento en los niveles de NO, podrían ser debidos a la reacción entre el NO y el $O_2^{\cdot -}$ explicada anteriormente, serían necesarios estudios adicionales que determinen de una manera más exacta esta hipótesis.

Estos datos amplían los ya conocidos sobre los mecanismos de acción del CCN2 a nivel vascular, y sirven para abrir un nuevo campo de visión en el que las acciones a través de las cuales CCN2(IV) contribuye al desarrollo del daño vascular podrían estar generadas por la regulación de mecanismos redox y la modulación del tono vascular.

4. CCN2(IV) activa la ruta la ruta NF- κ B y aumenta la síntesis de genes proinflamatorios a nivel vascular.

Tradicionalmente, CCN2 ha sido descrito como un mediador profibrótico de diferentes factores como Ang II, TGF- β o ET-1 (Leask et al., 2009). Sin embargo, estudios recientes están sugiriendo que CCN2 podría tener también un papel importante actuando como una citoquina proinflamatoria (Kular et al., 2011). En este sentido, se ha descrito que CCN2 puede actuar como un factor quimioatrayente de células mononucleares, como monocitos y macrófagos, y regular su adhesión y migración tanto en placas ateroscleróticas como en experimentos *in vitro* (Kular et al., 2011; Cicha et al., 2005). Existen también varios trabajos en los que se ha evaluado el papel del fragmento C-terminal de CCN2, CCN2(IV) en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria. Se ha demostrado que CCN2(IV) induce la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ humanos hacia linfocitos Th17 *in vitro* y que su administración sistémica en ratones produce una activación de la respuesta Th17 y de los factores relacionados con esta ruta en el riñón (Rodriguez-Diez et al., 2013). Del mismo modo, se ha descrito que la administración de CCN2(IV) en ratones, promueve la activación de la ruta NF- κ B y la generación de una respuesta inflamatoria a nivel renal (Sánchez-Lopez et al., 2009a). En otros tipos celulares en cultivo, como cardiomiocitos (Wang et al., 2010), células estrelladas pancreáticas (Karger et al., 2008) y células mesangiales y epiteliales renales (Sánchez-Lopez et al., 2009a; Wu et al., 2008), también se ha comprobado que, tanto CCN2 como CCN2(IV), inducen un aumento a nivel génico de factores proinflamatorios.

En el presente trabajo, se ha observado que la administración de CCN2(IV) en ratón produce una respuesta proinflamatoria local en la aorta, caracterizada por la sobreexpresión de citoquinas (IL-6 y TNF- α) y quimioquinas (MCP-1 y RANTES) proinflamatorias así como de moléculas de adhesión (ICAM-1). Además, mediante experimentos realizados en células en cultivo, se ha determinado que CCN2(IV) induce una respuesta proinflamatoria en CMLVs, caracterizada también por el aumento de diversos factores implicados en la respuesta inflamatoria como RANTES, IL-6 o ICAM-1. Entre los mecanismos de señalización intracelulares involucrados en la regulación de las respuestas inmunes e inflamatorias, uno de los más importantes es el que implica al factor de transcripción NF- κ B (Ruiz-Ortega et al., 2006; Sanz et al., 2010; Van der Heiden et al., 2010). Los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran claramente que CCN2(IV) produce una activación temprana de la ruta clásica de NF- κ B, tanto en CMLVs en cultivo como en aorta de ratón *in vivo*. En biopsias humanas de pacientes con diversas enfermedades cardiovasculares y en diferentes modelos experimentales de daño vascular, se ha descrito que existe una correlación entre la activación de NF- κ B y la sobrerregulación de factores proinflamatorios (López Franco et al., 2006; Martín Ventura et al., 2005; Ruiz-Ortega et al., 2006;

Savoia y Schiffrin, 2007; Van der Heiden et al., 2010), datos que son similares a los observados en el daño vascular producido por CCN2(IV) en el presente estudio. El uso de un inhibidor farmacológico de la ruta NF- κ B, Parthenolide, el cual ha sido utilizado previamente en varios modelos experimentales de daño renal y vascular (Estevan et al., 2004; López Franco et al., 2006), ha permitido determinar que la inhibición de la ruta NF- κ B disminuía significativamente los niveles génicos de los factores proinflamatorios sobreexpresados por el tratamiento con CCN2(IV) tanto en aorta de ratón *in vivo* como en CMLVs en cultivo. Por tanto, los datos obtenidos en el presente estudio, permiten concluir que CCN2(IV) induce la sobreexpresión de factores proinflamatorios a nivel vascular a través de la activación de la ruta NF- κ B.

5. CCN2(IV) no aumenta la síntesis de genes profibróticos ni la síntesis de MEC en aorta de ratón a las 24 horas.

TGF- β está aceptado comúnmente como uno de los principales factores inductores de fibrosis. Aunque varios autores han descrito que CCN2 actúa como un mediador de las acciones profibróticas inducidas por TGF- β (Leask, 2009), no queda suficientemente claro si a nivel fisiológico CCN2 actúa realmente como un mediador o como un coactivador de TGF- β . Estudios realizados en embriones de rana, han mostrado que CCN2 se une directamente a TGF- β y actúa como cofactor del mismo, aumentando tanto la unión de TGF- β con sus receptores como las consiguientes activaciones de sus respuestas intracelulares, incluida la ruta Smad (Abreu et al., 2002). Sin embargo, a día de hoy, la relevancia funcional de estas observaciones en células de mamífero se desconoce. Aunque en estudios iniciales realizados en fibroblastos y otros tipos celulares, se ha mostrado que el tratamiento con CCN2 recombinante induce un aumento en la producción de MEC (Frazier et al., 1996; Moussad y Brigstock, 2000; Yokoi et al., 2002), varios estudios realizados en ratones *in vivo* han mostrado que CCN2 por sí solo no es suficiente para inducir cambios fibróticos persistentes (Lasky et al., 1998). En este sentido, se ha descrito que la sobreexpresión de CCN2 en pulmones de rata solo causa una inducción temporal de la expresión del gen del procolágeno y una acumulación de matriz transitoria, pero no es suficiente para inducir una fibrosis progresiva (Bonniaud et al., 2003). Otros autores han observado que la inyección subcutánea de TGF- β o de CCN2, de manera individual, en ratones neonatos, da lugar a la producción de un tejido granular que desaparece a los pocos días, y que solamente la administración conjunta de ambos factores conduce a la aparición de una fibrosis subcutánea persistente (Mori et al., 1999). En el presente trabajo, se ha observado que el tratamiento de los ratones con CCN2(IV) no aumenta la síntesis de factores profibróticos, como TGF- β o PAI-1, ni aumenta la acumulación de colágeno en la aorta 24 horas después de su administración, lo cual estaría apoyando la idea ya establecida de que CCN2, por sí solo, puede no ser suficiente para inducir fibrosis vascular *in vivo*.

6. Interrelación entre CCN2(IV), ROS, NF-κB y factores proinflamatorios en la pared vascular.

Aunque, como se ha comentado anteriormente, CCN1 también tiene la capacidad de inducir la producción de ROS en determinadas estirpes celulares, se ha descrito que los ROS generados a través de este factor regulan posteriormente la activación de las proteínas quinasas p38 y JNK, pero no interfirieron en la modulación de la ruta NF-κB (Chen et al., 2007). Sin embargo, en el presente estudio, se ha demostrado que el aumento en la síntesis de $O_2^{\cdot -}$ producido por CCN2(IV) en aorta de ratón *in vivo* y en CMLVs en cultivo, regula posteriormente la activación de la ruta NF-κB y de los genes proinflamatorios relacionados con su activación. Los datos obtenidos, contribuyen a demostrar que los mecanismos mediante los cuales las proteínas de la familia CCN regulan procesos redox y los mecanismos de acción de los ROS generados por ellas, pueden ser diferentes dependiendo del miembro de la familia que actúe y del tipo celular en el que tengan lugar sus efectos.

Existen diferentes vías a través de las cuales los ROS pueden interaccionar con la ruta de señalización NF-κB, ya que hay una gran variedad de enzimas involucradas en el metabolismo de los ROS que están reguladas a su vez por esta ruta. Dentro del grupo de enzimas reguladas por NF-κB, se encuentran algunas implicadas en la síntesis de ROS, como la Nox2, la Xantina Oxidasa o la Ciclooxygenasa-2; y otras involucradas en su degradación, como la Catalasa, la SOD o la Hemoxigenasa-1 (Morgan y Liu, 2011). Estas evidencias, han propiciado que la activación de ROS mediada por la ruta NF-κB haya sido uno de los mecanismos más estudiados en la relación entre ambas rutas. Sin embargo, también se ha descrito otro tipo de relación en la que son los propios ROS los que regulan la activación de la ruta NF-κB (Morgan y Liu, 2011). En este sentido, los datos obtenidos en este trabajo han demostrado, mediante diferentes técnicas, que el aumento en la producción de $O_2^{\cdot -}$ generado por CCN2(IV), tanto en aorta de ratón *in vivo* como en CMLVs en cultivo, esta regulando la activación de la ruta NF-κB y la sobreexpresión de diversos genes proinflamatorios relacionados con la activación de esta ruta. Por un lado, se ha comprobado que el bloqueo en la activación de Nox1 *in vitro*, utilizando un silenciador génico o un inhibidor farmacológico, inhibe la activación de la ruta NF-κB y la sobreexpresión de los genes proinflamatorios inducidos por CCN2(IV). Por otro lado, también se ha podido determinar que el silenciamiento génico en ratones mediante el uso de un Oligo-Morfolino frente a Nox1 o el tratamiento con el antioxidante Apocinina, inhibe la activación de la ruta NF-κB y la sobreexpresión de genes proinflamatorios observadas en las aortas de los ratones 24 horas después de la administración de CCN2(IV).

Con todos estos resultados, se puede determinar que existe una cascada de activación en CMLVs en la que CCN2(IV), a través de la activación de Nox1, induce un aumento en la producción de $O_2^{\cdot -}$, y este, a su vez, conduce posteriormente a una activación de la ruta NF-κB y a un aumento en la síntesis de diversos factores proinflamatorios.

7. EGFR regula la cascada de señalización inducida por CCN2(IV) en aorta de ratón y en CMLVs.

En los últimos años, una de las opciones terapéuticas que ha emergido como tratamiento para el cáncer ha sido el bloqueo de la señalización mediada por el receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGFR. Este receptor, tiene la capacidad de ser activado por ligandos diferentes y regular diversos procesos, como el crecimiento y la migración celular o la angiogénesis (Schreier et al., 2014). Se han publicado numerosos trabajos donde se le ha atribuido al EGFR un papel muy importante en la patogénesis de diversas enfermedades, como la aterosclerosis, la hipertensión o la diabetes tipo 2 (Dreux et al., 2006; Kagiya et al., 2002; Matrougui, 2010). A nivel vascular, se ha descrito la expresión de EGFR en la superficie celular de CMLVs y de CEs y, además, se ha demostrado también la capacidad que tienen ambos tipos celulares de producir ligandos para este receptor (Makki et al., 2013).

Existen dos mecanismos diferentes a través de los cuales puede activarse la señalización mediada por EGFR. Por un lado, este receptor puede activarse por una unión directa con diferentes ligandos como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento epidérmico unido a heparina, el factor de crecimiento tumoral alfa o la anfiregulina (Schreier et al., 2014). Por otro lado, tiene también la capacidad de activarse a través de una transactivación mediada por algún estímulo extracelular, entre los que se encuentran diferentes agonistas de receptores acoplados a proteínas G, como Ang II, y diversas citoquinas o integrinas (Schreier et al., 2014). Uno de los mecanismos de transactivación del EGFR más estudiado es el mediado por la Ang II, a través del cual se ha observado un aumento en la actividad NAD(P)H oxidasa en CMLVs de rata en cultivo, que conduce a la generación de ROS e induce a las células a diferenciarse hacia un fenotipo proinflamatorio (Seshiah et al., 2002). Dentro de los ligandos que poseen la capacidad de unirse al EGFR y activar su señalización intracelular, recientemente se ha demostrado que CCN2 puede actuar como ligando del EGFR uniéndose a su dominio extracelular, promoviendo una activación de la quinasa de ERK y desencadenando la sobreexpresión de factores proinflamatorios que contribuyen al daño renal en ratón (Rayego-Mateos et al., 2013). Apoyando este último estudio, también existe un trabajo en células de adenocarcinoma pulmonar, en el que se ha descrito un mecanismo por el cual la unión de CCN2 con EGFR induce la ubiquitinación y degradación del receptor, lo cual ha servido para postular que CCN2 podría ser utilizado como un tratamiento para prevenir la metástasis en pacientes con cáncer de pulmón (Chang et al., 2013).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el tratamiento con CCN2(IV) activa EGFR, tanto en aorta de ratón *in vivo* como en CMLVs en cultivo, y que a través de esta activación se produce un aumento en la actividad de Nox1 y en la producción de $O_2^{\cdot-}$, que conduce a la modulación de diferentes respuestas vasculares, como son la activación de la ruta NF- κ B y el aumento en la síntesis de factores proinflamatorios, un aumento en la nitrosilación de proteínas, la modificación de la función vascular y el desarrollo de disfunción endotelial (Figura 46).

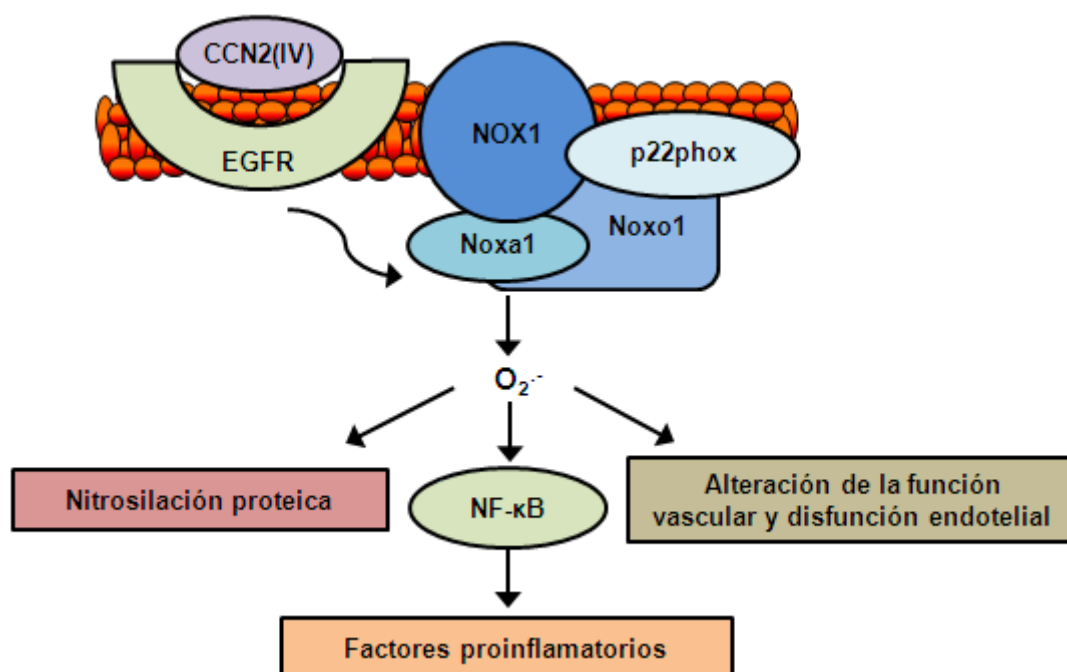


Figura 46. Esquema representativo de las acciones mediadas por CCN2(IV) a nivel vascular.

8. Niveles circulantes de CCN2 en diversas patologías humanas

Algunos estudios han propuesto la posibilidad de utilizar los niveles circulantes de CCN2 como un biomarcador de riesgo en diferentes tipos de enfermedades crónicas renales, como la nefropatía diabética humana o la fibrosis renal (Riser et al., 2003; Tam et al., 2009; Phanish et al., 2010; Slagman et al., 2011), y en determinadas patologías cardíacas, como la fibrosis cardíaca y el fallo cardíaco crónico, donde se ha demostrado que podría ser un biomarcador de disfunción cardíaca (Koitabashi et al., 2008). En pacientes con nefropatía diabética tipo 1, se ha descrito que los niveles plasmáticos elevados de CCN2 pueden ser un predictor independiente del estadio final y la mortalidad (Nguyen et al., 2008), mientras que los niveles elevados en orina de este factor se han asociado con las primeras etapas de desarrollo de esta enfermedad (Tam et al., 2009). A nivel cardiovascular, en este mismo tipo de pacientes con nefropatía diabética tipo 1, se ha asociado el incremento en los niveles de CCN2 plasmático con un aumento en la presión arterial y con un engrosamiento de la íntima-media en la arteria carótida (Jaffa et al., 2008). Otro de los estudios en los que se han evaluado los niveles circulantes de CCN2 en una patología cardiovascular, ha demostrado que en pacientes con tumores neuroendocrinos existía una correlación entre el

aumento en los niveles plasmáticos de CCN2 y la aparición de una reducción en la función del ventrículo derecho más agravada (Bergestuen et al., 2010).

Existen numerosos trabajos en los que se han medido los niveles circulantes en plasma y en orina, tanto de la molécula completa de CCN2 como de los fragmentos N- y C-terminal. En algunos estudios, los niveles de CCN2 se han determinado utilizando anticuerpos que reconocen únicamente la porción N-terminal (Nguyen et al., 2006) mientras que en otros estudios los anticuerpos utilizados solo reconocen el fragmento C-terminal (Riser et al., 2003; Bao et al., 2008; Tam et al., 2009), lo que parece indicar la independencia que existe entre ambos fragmentos y la molécula completa en cuanto a su producción y a su función. En este sentido, se ha detectado que en pacientes con escleroderma existe un aumento del fragmento N-terminal del CCN2 en el fluido intersticial de la dermis, el cual está asociado de manera positiva con la severidad de la enfermedad en la piel y sirve como marcador de un fenotipo fibrótico de la enfermedad (Dziadzio et al., 2005). Sin embargo, en este mismo estudio, no se encontraron diferencias en los niveles del CCN2 completo o del fragmento C-terminal (Dziadzio et al., 2005). En otro trabajo realizado en pacientes con retinopatía diabética se obtuvieron resultados similares, de tal modo que se encontró un incremento en los niveles del fragmento N-terminal en el vítreo ocular de los pacientes pero no se detectaron diferencias en los niveles del CCN2 completo ni del fragmento C-terminal (Hinton et al., 2004).

Los estudios publicados en los que se evalúan los niveles de CCN2 en diversas patologías han reflejado resultados bastante dispares. Este es el caso de diversos estudios realizados en pacientes con nefropatía diabética en los que se evaluó la excreción urinaria de CCN2 y se describieron incrementos desde 0,5 veces (Nguyen et al., 2006) 6 veces (Riser et al., 2003) y de 10 a 100 veces, dependiendo de si se trataba de pacientes con micro albuminuria o con macro albuminuria sin tratar (Gilbert et al., 2003). Estas diferencias pueden explicarse por la inexistencia de un ELISA comercial y la falta de estandarización en los métodos de cuantificación, ya que en uno de los estudios las medidas de CCN2 se realizaron utilizando un ELISA casero y teniendo en cuenta los valores brutos obtenidos, mientras que en los otros dos estudios se optó por utilizar un ELISA de una compañía biotecnológica y corregir los valores obtenidos frente a los niveles de creatinina detectados en orina.

Existen también varios estudios donde se han evaluado los niveles circulantes de CCN2 en diferentes patologías. En un estudio realizado en pacientes con tumores neuroendocrinos se ha detectado que una cantidad igual o superior a 77 ng/ml, evaluada utilizando un anticuerpo que reconoce únicamente el fragmento C-terminal, sirve como predictor independiente para determinar una reducción de la función ventricular derecha (Bergestuen et al., 2010). Por otro lado, un trabajo realizado en pacientes con infección crónica de hepatitis B, determinó que existían diferencias en los niveles séricos de CCN2 en los pacientes en estado avanzado de fibrosis (36,9 ng/ml) con cirrosis (43,6 ng/ml) y con carcinoma hepatocelular primario (38,5 ng/ml), en comparación con los sujetos control (17,7 ng/ml) (Gressner et al., 2013). En cuanto a los niveles circulantes de CCN2

en patologías cardiovasculares, recientemente se ha publicado un estudio en pacientes con fibrilación atrial no-paroxística en el que describen que los niveles séricos basales de CCN2 en estos pacientes pueden ser utilizados para predecir la recurrencia después de una ablación cardiaca por catéter, ya que en los pacientes que presentaban unos niveles basales de CCN2 inferiores (746,3 ng/ml) tenía lugar menos episodios de recurrencia en la fibrilación que en los pacientes con niveles basales superiores (936,5 ng/ml) (Song et al., 2014).

Las dosis utilizadas en el presente trabajo tanto en los experimentos *in vitro* y *ex vivo* (50 ng/ml) como en los modelos experimentales en ratón (2,5 ng/g de peso de ratón), son similares a los niveles de CCN2 circulante detectados en diversas patologías. Los resultados obtenidos en este estudio, por tanto, sugieren que en las enfermedades en las que los niveles de CCN2 se encuentran elevados, este factor podría estar mediando, de manera adicional al resto de acciones en las que se ha descrito su participación, un aumento en la producción de ROS, en la activación de la ruta NF- κ B y en la sobreproducción de factores proinflamatorios, lo cual contribuye a aumentar la importancia que puede tener este factor en el desarrollo de numerosas patologías.

9. Nueva visión de CCN2(IV) como factor a tener en cuenta en la inflamación vascular

Aunque se ha descrito que varios factores proinflamatorios, como la Ang II o la ET-1, producen un fuerte aumento en la expresión de CCN2, tanto en CMLVs como en CEs (Rodríguez Vita et al., 2005a; Ruperez et al., 2003), existen pocos estudios en los que se evalúe la contribución directa que realiza el CCN2 en el daño vascular. En un modelo de angioplastia en carótida de rata se ha descrito que CCN2, a través de Smad3, regula el remodelado adaptativo y la hiperplasia neointimal induciendo la proliferación de las CMLVs en la capa media de la arteria (Kundi et al., 2009). Además, también se ha observado que CCN2 puede estimular la transdiferenciación de CMLVs a osteoblastos a través de la activación de ERK, lo cual puede tener una gran importancia en la calcificación vascular que tiene lugar en diversas patologías como la aterosclerosis (Huang et al., 2013).

Se han realizado varios estudios, *in vitro* e *in vivo*, donde se han publicado algunos datos contradictorios sobre el papel que desempeñaría CCN2 en el sistema vascular. Por un lado, se ha descrito que en cardiomiocitos de neonatos de rata, tanto el fragmento CCN2 completo como el CCN2(IV) producen un aumento del área de la superficie celular mediante un proceso dependiente de la activación de Akt, lo cual sugiere la importancia que puede tener CCN2 en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca (Hayata et al., 2008). También se ha descrito que la inhibición de CCN2 reduce el remodelado del ventrículo izquierdo y la disfunción cardiaca en modelos de daño cardiaco en ratón (Szabó et al., 2014). Sin embargo, se ha demostrado que en ratones transgénicos con una sobreexpresión de CCN2 a nivel cardiaco, el tamaño del infarto producido mediante un modelo experimental de isquemia-reperfusión es significativamente más bajo que el observado en los ratones normales, sugiriendo en este caso que CCN2 conferiría una

cardioprotección mediada por la inhibición de la actividad de la GSK-3 β , la activación de Smad2 y el reprogramado de la expresión génica (Ahmed et al., 2011). Por otro lado, en este mismo tipo de ratones transgénicos, se ha demostrado que la sobreexpresión de CCN2 genera hipertrofia en las células cardíacas, aunque sin desarrollo de fibrosis, y ayuda a la conservación de la función cardíaca sometida a un aumento de la presión arterial causada por la administración sistémica de Ang II (Panek et al., 2009).

También se han realizado estudios en modelos experimentales de fibrosis, donde se han encontrado efectos beneficiosos del bloqueo de CCN2. En un modelo experimental de fibrosis hepática en ratas, se ha comprobado que el silenciamiento génico de CCN2 previene la aparición de fibrosis producida por la administración de tetracloruro de carbono (CCl₄) (Hao et al., 2014). En este sentido, otro trabajo ha descrito que la inhibición de CCN2 previene el remodelado pulmonar en ratas expuestas al humo del tabaco (Wang et al., 2011). Todos estos trabajos inciden en la importancia que tiene el CCN2 en la acumulación de MEC y en el desarrollo de la fibrosis en diferentes patologías humanas; sin embargo, a día de hoy, no existen estudios que describan el papel directo que desempeña CCN2 en enfermedades inflamatorias vasculares.

Dentro de las enfermedades inflamatorias vasculares, hay una que resalta por encima del resto debido a la importancia que tiene en el desarrollo de la mayoría de las ECVs, la aterosclerosis. Se trata de una enfermedad vascular inflamatoria crónica con un desarrollo dinámico, en el que la vulnerabilidad de las placas, por ruptura o por erosión, puede inducir diferentes eventos cardiovasculares como un infarto trombo-embólico o un ataque isquémico transitorio (AIT). En este sentido, se ha descrito que las placas de los pacientes postinfarto sufren un remodelado que las conduce a un fenotipo más estable, mientras que las placas de los pacientes post-AIT se mantienen sin cambios (Peeters et al., 2009; Redgrave et al., 2006). Un estudio realizado en pacientes postinfarto y post-AIT, reveló un aumento en los niveles de CCN2 en las placas de pacientes que sufrieron un infarto en comparación con las placas de pacientes que cursaron con AIT, lo cual se correlacionaba además con un aumento en los niveles de colágeno y de CMLVs. Este estudio también reflejó que existía, tanto una correlación positiva entre los niveles de CCN2 y de marcadores antiinflamatorios (IL-4, IL-5 e IL-10) como una correlación negativa entre la actividad de las enzimas de degradación de matriz (MMP-8 y MMP-9) y los niveles del propio CCN2, en las placas de los diferentes pacientes estudiados (Leeuwis et al., 2010). Existen también estudios en los que se han detectado niveles elevados de ARNm de CCN2 en lesiones ateroscleróticas avanzadas, localizados principalmente en el hombro de la placa y en colocalización con el infiltrado inflamatorio (Cicha et al., 2005; Oemar et al., 1997). A pesar de todos estos datos sugiriendo la importancia de este factor en el desarrollo y patogenia de las placas ateroscleróticas, no existen estudios evaluando el efecto del bloqueo de CCN2 en aterosclerosis experimental.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que CCN2, mediante la activación de procesos redox y la sobreexpresión de factores proinflamatorios en las CMLVs de las paredes vasculares, podría participar en la aparición y evolución del daño vascular asociado a diferentes patologías. Estos datos, sirven para ampliar el concepto existente sobre el papel que juega CCN2 en diversas enfermedades, como por ejemplo la aterosclerosis, en la que tradicionalmente se ha relacionado este factor con estadios avanzados de la enfermedad. A la vista de los resultados obtenidos en el presente trabajo y con el objetivo de trasladar estos estudios a la clínica, debería valorarse la capacidad que tiene CCN2 de activar ROS e inducir factores proinflamatorios y tener en cuenta a este factor como posible biomarcador o diana terapéutica a estudiar en diferentes patologías cardiovasculares.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- 1- En un modelo de daño vascular inducido por Ang II en ratón, la producción de CCN2 en aorta se asocia con el aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$, sugiriendo que CCN2 podría estar involucrado en la producción de $O_2^{\cdot-}$ en el daño vascular.
- 2- CCN2(IV) aumenta la producción de $O_2^{\cdot-}$ y la actividad de la NAD(P)H oxidasa a nivel vascular, tanto en CMLVs y ECs en cultivo, como en aorta de ratón, *ex vivo* e *in vivo*.
- 3- CCN2(IV) aumenta la respuesta contráctil vascular y genera disfunción endotelial.
- 4- El tratamiento con CCN2(IV) en CMLVs y en aorta de ratón *in vivo*, induce la expresión de genes proinflamatorios y activa la ruta NF- κ B.
- 5- La administración de CCN2(IV) en ratón no induce cambios en los niveles de factores profibróticos en aorta a las 24 horas.
- 6- CCN2(IV), vía Nox1, induce la producción de $O_2^{\cdot-}$, el cual causa disfunción endotelial y aumenta la nitrosilación proteica.
- 7- Las respuestas proinflamatorias activadas por CCN2(IV) están reguladas por un aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ derivado de la actividad de Nox1, demostrando la existencia de una interconexión entre los procesos redox e inflamatorios inducidos por CCN2(IV) a nivel vascular.
- 8- Las acciones vasculares observadas en respuesta a CCN2(IV) están mediadas por la activación del EGFR.

En conjunto, estos resultados sugieren que CCN2 puede regular procesos redox y respuestas inflamatorias mediante la activación del EGFR a nivel vascular, lo que amplía la visión tradicional de CCN2 de un mediador profibrótico a una citoquina proinflamatoria y le confiere una importancia aún mayor en las patologías cardiovasculares.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham DJ, Shiwen X, Black CM et al. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *J Biol Chem*. 2000;275(20):15220-5.
- Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B et al. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF- β . *Nature cell biology*. 2002;4(8):599-604.
- Adams DH, Lloyd AR. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet*. 1997;349(9050):490-5.
- Aguiló A, Tauler P, Fuentespina E et al. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiol Behav*. 2005;84(1):1-7.
- Ahmed MS, Øie E, Vinge LE, et al. Connective tissue growth factor--a novel mediator of angiotensin II-stimulated cardiac fibroblast activation in heart failure in rats. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;36(3):393-404.
- Ahmed MS, Øie E, Vinge LE, et al. Induction of pulmonary connective tissue growth factor in heart failure is associated with pulmonary parenchymal and vascular remodeling. *Cardiovasc Res*. 2007;74(2):323-33.
- Ahmed MS, Gravning J, Martinov VN, et al. Mechanisms of novel cardioprotective functions of CCN2/CTGF in myocardial ischemia- reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300: H1291–H1302.
- Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 2):217-24.
- Babic AM, Chen C-C, Lau LF. Fisp12/Mouse Connective Tissue Growth Factor Mediates Endothelial Cell Adhesion and Migration through Integrin $\alpha\beta 3$, Promotes Endothelial Cell Survival, and Induces Angiogenesis In Vivo. *Molecular and Cellular Biology*. 1999;19(4):2958-2966.
- Baker KM, Booz GW, Dostal DE. Cardiac actions of angiotensin II: Role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol*. 1992;(54):227-41.
- Balakumar P, Jagadeesh G. A century old renin-angiotensin system still grows with endless possibilities: AT1 receptor signaling cascades in cardiovascular physiopathology. *Cell Signal*. 2014;26(10):2147-60.
- Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;(14):649-83.
- Bamias G, Clark DJ, Rivera-Nieves J. Leukocyte Traffic Blockade in Inflammatory Bowel Disease. *Current drug targets*. 2013;14(12):1490-1500.
- Bao J, Tu Z, Wang J, et al. A novel accurate rapid ELISA for detection of urinary connective tissue growth factor, a biomarker of chronic allograft nephropathy. *Transplant Proc*. 2008;40(7):2361-4.
- Bays HE. Lowering low-density lipoprotein cholesterol levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *International Journal of General Medicine*. 2014;7:355-364.
- Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*. 2007(1):245-313.
- Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kB1 and NF-kB2 in immune cell biology. *Biochemical Journal*. 2004;382(Pt 2):393-409.
- Bergestuen DS, Gravning J, Haugaa KH, et al. Plasma CCN2/connective tissue growth factor is associated with right ventricular dysfunction in patients with neuroendocrine tumors. *BMC Cancer*. 2010;10:6.

- Bhat OM, Kumar PU2, Giridharan NV3, et al. Interleukin-18-induced atherosclerosis involves CD36 and NF- κ B crosstalk in Apo E-/- mice. *J Cardiol*. 2014. pii: S0914-5087(14)00319-0.
- Blum A. HMG-CoA reductase inhibitors (statins), inflammation, and endothelial progenitor cells-New mechanistic insights of atherosclerosis. *Biofactors*. 2014; 40(3):295-302.
- Bonizzi G, Bebien M, Otero DC, et al. Activation of IKK α target genes depends on recognition of specific κ B binding sites by RelB:p52 dimers. *The EMBO Journal*. 2004;23(21):4202-4210.
- Bonniaud P, Margetts PJ, Kolb M, et al. Adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the lung induces transient fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(7):770-8.
- Böttinger EP. TGF-beta in renal injury and disease. *Semin Nephrol*. 2007;27(3):309-20.
- Branchetti E, Poggio P, Sainger R, et al. Oxidative stress modulates vascular smooth muscle cell phenotype via CTGF in thoracic aortic aneurysm. *Cardiovascular Research*. 2013;100(2):316-324.
- Brandes RP, Schröder K. Differential vascular functions of Nox family NADPH oxidases. *Curr Opin Lipidol*. 2008;19(5):513-8.
- Brandes RP. Vascular functions of NADPH oxidases. *Hypertension*. 2010;56(1):17-21.
- Brigstock DR, Steffen CL, Kim GY et al. Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine secretory fluids. Identification as heparin-regulated Mr 10,000 forms of connective tissue growth factor. *J Biol Chem*. 1997;272(32):20275-82.
- Briones AM, Rodríguez-Criado N, Hernanz R et al. Atorvastatin prevents an- giotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stress. *Hypertension*. 2009 (54): 142–149.
- Briones AM, Touyz RM. Oxidative stress and hyper- tension: current concepts. *Curr Hypertens Rep*. 2010;12:135– 142.
- Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*. 1991;67(6):1033-6.
- Cachofeiro Ramos V, Sanz-Rosa D, de las Heras Jiménez, et al. Inflamación, disfunción endotelial e hipertensión arterial. *Hipertensión*. 2004;21(7):347-354.
- Carbone, F, Montecucco, F. Inflammation in arterial diseases. *IUBMB Life*. 2015; doi: 10.1002/iub.1344.
- Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*.1994;84(7): 2068-101.
- Cicha I, Yilmaz A, Klein M, et al. Connective tissue growth factor is overexpressed in complicated atherosclerotic plaques and induces mononuclear cell chemotaxis in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(5):1008-13.
- Cichon MA, Radisky DC. Extracellular matrix as a contextual determinant of transforming growth factor- β signaling in epithelial-mesenchymal transition and in cancer. *Cell Adh Migr*. 2014;8(6):588-94.
- Cohen RA, Tong X. Vascular oxidative stress: the common link in hypertensive and diabetic vascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010;(4):308-16.
- Chang C-C, Yang M-H, Lin B-R, et al. CCN2 inhibits lung cancer metastasis through promoting DAPK-dependent anoikis and inducing EGFR degradation. *Cell Death and Differentiation*. 2013;20(3):443-455.
- Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*. 2004;95(9):858-66.
- Chen C-C, Lau LF. Functions and Mechanisms of Action of CCN Matricellular Proteins. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009;41(4):771-7.
- Chen CC, Young JL, Monzon RI, et al. Cytotoxicity of TNF α is regulated by integrin-mediated matrix signaling. *The EMBO Journal*. 2007;26(5):1257-1267.

- Chen G, Grotendorst G, Eichholtz T, et al. GM-CSF increases airway smooth muscle cell connective tissue expression by inducing TGF-beta receptors. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284(3):L548-56.
- Chen W, Jin W, Cook M et al. Oral delivery of group A streptococcal cell walls augments circulating TGF-beta and suppresses streptococcal cell wall arthritis. *J Immunol*. 1998;161(11):6297-304.
- Chen Y, Blom IE, Sa S, et al. CTGF expression in mesangial cells: involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC. *Kidney Int*. 2002;62(4):1149-59.
- Cheng HS, Njock M-S, Khyzha N, et al. Noncoding RNAs regulate NF-κB signaling to modulate blood vessel inflammation. *Frontiers in Genetics*. 2014;5:422.
- Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*. 2000;50(4-5):279-89.
- de Winther MP, Kanters E, Kraal G et al. Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 May;25(5):904-14.
- de Winter P, Leoni P, Abraham D. Connective tissue growth factor: structure-function relationships of a mosaic, multifunctional protein. *Growth Factors*. 2008;26(2):80-91.
- Dézsi CA. A review of clinical studies on angiotensin II receptor blockers and risk of cancer. *Int J Cardiol*. 2014;177(3):748-53.
- Dreux AC, Lamb DJ, Modjtahedi H, et al. The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis. *Atherosclerosis*. 2006;186(1):38-53.
- Drexler H, Kurz S, Jeserich M et al. Effect of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition on endothelial function in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol*. 1995;76(15):13E-18E.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95.
- Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, et al. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J*. 1999;13(13):1774-86.
- Dziadzio M, Usinger W, Leask A, et al. N-terminal connective tissue growth factor is a marker of the fibrotic phenotype in scleroderma. *QJM*. 2005;98(7):485-92.
- Egashira K, Hirooka Y, Kai H, et al. Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia. *Circulation*. 1994;89(6):2519-24.
- Eichstädt HW, Eskötter H, Hoffman I, et al. Improvement of myocardial perfusion by short-term fluvastatin therapy in coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1995;76(2):122A-125A.
- Esteban V, Lorenzo O, Rupérez M, et al. Angiotensin II, via AT1 and AT2 receptors and NF-κB pathway, regulates the inflammatory response in unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(6):1514-29.
- Ferri C, Desideri G, Baldoncini R et al. Early activation of vascular endothelium in nonobese, nondiabetic essential hypertensive patients with multiple metabolic abnormalities. *Diabetes*. 1998; 47(4):660-7.
- Frazier K, Williams S, Kothapalli D, et al. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol*. 1996;107(3):404-11.
- Fu M, Zhang J, Lin Y, et al. Early stimulation and late inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) gene expression by transforming growth factor beta in human aortic smooth muscle cells: role of early growth-response factor-1 (Egr-1), activator protein 1 (AP1) and Smads. *Biochemical Journal*. 2003;370(Pt 3):1019-1025.
- Futterman LG, Lemberg L. Statin pleiotropy: fact or fiction?. *Am J Crit Care*. 2004;13(3):244-9.

- Gasic S, Wagner OF, Fasching P, et al. Fosinopril decreases levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in borderline hypertensive type II diabetic patients with microalbuminuria. *Am J Hypertens*. 1999 (2 Pt 1):217-22.
- Gianni D, Taulet N, Zhang H, et al. A novel and specific NADPH oxidase-1 (Nox1) small-molecule inhibitor blocks the formation of functional invadopodia in human colon cancer cells. *ACS chemical biology*. 2010;5(10):981-993.
- Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest*. 1992;90(2):456-61.
- Giladi E, Raz E, Karmeli F, et al. Transforming growth factor-beta gene therapy ameliorates experimental colitis in rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1995;(4):341-7.
- Gilbert RE, Akdeniz A, Weitz S, et al. Urinary connective tissue growth factor excretion in patients with type I diabetes and nephropathy. *Diabetes Care*. 2003;26(9):2632-6.
- Global atlas on cardiovascular disease prevention and control 2011. Disponible en: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas_cvd/en/. [Accesado el día 20 de marzo de 2015].
- Global status report on noncommunicable diseases 2010. Disponible en: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/es/. [Accesado el día 20 de marzo de 2015].
- Gomolak JR, Didion SP. Angiotensin II-induced endothelial dysfunction is temporally linked with increases in interleukin-6 and vascular macrophage accumulation. *Front Physiol*. 2014; 5: 396.
- González J, Valls N, Brito R, et al. Essential hypertension and oxidative stress: New insights. *World Journal of Cardiology*. 2014;6(6):353-366.
- Gravning J, Ørn S, Kaasbøll OJ et al. Myocardial Connective Tissue Growth Factor (CCN2/CTGF) Attenuates Left Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction. Salloum FN, ed. *PLoS ONE*. 2012;7(12):e52120.
- Gravning J, Ahmed MS, von Lueder TG et al. CCN2/CTGF attenuates myocardial hypertrophy and cardiac dysfunction upon chronic pressure-overload. *Int J Cardiol*. 2013;168(3):2049-56.
- Gressner OA, Fang M, Li H, et al. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in serum is an indicator of fibrogenic progression and malignant transformation in patients with chronic hepatitis B infection. *Clin Chim Acta*. 2013;421:126-31.
- Griendling KK. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart*. 2004;90(5):491-3.
- Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassègue B, et al. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension*. 1997;29(1 Pt 2):366-73.
- Grotendorst GR. Connective tissue growth factor: a mediator of TGF-beta action on fibroblasts. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997;8(3):171-9.
- Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*. 2006;2006(357):re13.
- Hall-Glenn F, Lyons KM. Roles for CCN2 in normal physiological processes. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2011;68(19):3209-3217.
- Hao C, Xie Y, Peng M, et al. Inhibition of connective tissue growth factor suppresses hepatic stellate cell activation in vitro and prevents liver fibrosis in vivo. *Clin Exp Med*. 2014;14(2):141-50.
- Hashimoto G, Inoki I, Fujii Y, et al. Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 2002;277(39):36288-95.

- Hayata N, Fujio Y, Yamamoto Y, et al. Connective tissue growth factor induces cardiac hypertrophy through Akt signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;370(2):274-8.
- Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes & Development*. 2012;26(3):203-234.
- Hinton DR, Spee C, He S, et al. Accumulation of NH2-terminal fragment of connective tissue growth factor in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2004;27(3):758-64.
- Hoshijima M, Hattoria T, Inouea M, et al. CT domain of CCN2/CTGF directly interacts with fibronectin and enhances cell adhesion of chondrocytes through integrin $\alpha 5\beta 1$. *FEBS Letters*. 2006; 580:1376–1382
- Huang J, Huang H, Wu M, et al. Connective tissue growth factor induces osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells through ERK signaling. *Int J Mol Med*. 2013;32(2):423-9.
- Hundae A, McCullough PA. Cardiac and renal fibrosis in chronic cardiorenal syndromes. *Nephron Clin Pract*. 2014;127(1-4):106-12
- Inoki I, Shiomi T, Hashimoto G, et al. Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *FASEB J*. 2002;16(2):219-21.
- Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, et al. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development (Cambridge, England)*. 2003;130(12):2779-2791.
- Iwanciw D, Rehm M, Porst M, et al. Induction of connective tissue growth factor by angiotensin II: integration of signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(10):1782-7
- Jaffa AA, Usinger WR, McHenry MB, et al. Connective Tissue Growth Factor and Susceptibility to Renal and Vascular Disease Risk in Type 1 Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2008;93(5):1893-1900.
- Javelaud D, Mauviel A. Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(7):1161-5.
- Jialal I, Stein D, Balis D, et al. Effect of hydroxymethyl glutaryl coenzyme a reductase inhibitor therapy on high sensitive C-reactive protein levels. *Circulation*. 2001;103(15):1933-5.
- Jin YX, Xu LY, Guo H, et al. TGF-beta1 inhibits protracted-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by activating dendritic cells. *J Autoimmun*. 2000;14(3):213-20.
- Juric V, Chen C-C, Lau LF. Fas-Mediated Apoptosis Is Regulated by the Extracellular Matrix Protein CCN1 (CYR61) In Vitro and In Vivo. *Molecular and Cellular Biology*. 2009;29(12):3266-3279.
- Kagami S, Border WA, Miller DE, et al. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1994;93(6):2431-2437.
- Kagiya S, Eguchi S, Frank GD, et al. Angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and hypertension are attenuated by epidermal growth factor receptor antisense. *Circulation*. 2002;106(8):909-12.
- Karger A, Fitzner B, Brock P, et al. Molecular insights into connective tissue growth factor action in rat pancreatic stellate cells. *Cell Signal*. 2008;20(10):1865-72.
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:621-63.
- Kim H-S, Nagalla SR, Oh Y, et al. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): Characterization of connective tissue growth factor as a

- member of the IGFBP superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(24):12981-12986.
- Kim K-H, Chen C-C, Monzon RI, et al. Matricellular Protein CCN1 Promotes Regression of Liver Fibrosis through Induction of Cellular Senescence in Hepatic Myofibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*. 2013;33(10):2078-2090.
 - Kjeldsen S, Feldman RD, Lisheng L, et al. Updated National and International Hypertension Guidelines: A Review of Current Recommendations. *Drugs*. 2014; 74(17):2033-2051.
 - Klingenberg R, Hansson GK. Treating inflammation in atherosclerotic cardiovascular disease: emerging therapies. *Eur Heart J*. 2009; (23):2838-44.
 - Koitabashi N, Arai M, Niwano K, et al. Plasma connective tissue growth factor is a novel potential biomarker of cardiac dysfunction in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2008;10(4):373-9.
 - Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, et al. NADPH Oxidases in Vascular Pathology. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;20(17):2794-2814.
 - Kular L, Pakradouni J, Kitabgi P, et al. The CCN family: a new class of inflammation modulators?. *Biochimie*. 2011;(93): 377–388.
 - Kundi R, Hollenbeck ST, Yamanouchi D, et al. Arterial gene transfer of the TGF-beta signalling protein Smad3 induces adaptive remodelling following angioplasty: a role for CTGF. *Cardiovasc Res*. 2009;84:326–335,.
 - Lasky JA, Ortiz LA, Tonthat B, et al. Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol*. 1998;275(2 Pt 1):L365-71.
 - Lassègue B, Sorescu D, Szöcs K, et al. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res*. 2001;88(9):888-94.
 - Lassègue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;285(2):R277-97.
 - Laurindo FR, Fernandes DC, Santos CX. Assessment of superoxide production and NADPH oxidase activity by HPLC analysis of dihydroethidium oxidation products. *Methods Enzymol*. 2008;441:237-60.
 - Leask A. Signaling in fibrosis: targeting the TGF beta, endothelin-1 and CCN2 axis in scleroderma. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2009;1:115-22.
 - Leask A. CCN2/decorin interactions: a novel approach to combating fibrosis?. *J Cell Commun Signal*. 2011;5: 249–250.
 - Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J*. 2004;18(7):816-27.
 - Leask A, Abraham DJ. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 23):4803-10.
 - Leask A, Parapuram SK, Shi-wen X, et al. Connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) gene regulation: a potent clinical bio-marker of fibroproliferative disease?. *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2009;3(2):89-94.
 - Lee CI, Guh JY, Chen HC, et al. Leptin and connective tissue growth factor in advanced glycation end-product-induced effects in NRK-49F cells. *J Cell Biochem*. 2004 ;93(5):940-50.
 - Leeuwis JW, Nguyen TQ, Theunissen MG, et al. Connective tissue growth factor is associated with a stable atherosclerotic plaque phenotype and is involved in plaque stabilization after stroke. *Stroke*. 2010;41(12):2979-81.
 - Li MO, Wan YY, Sanjabi S et al. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2006;(24):99-146.

- Liu X, Luo F, Li J, et al. Homocysteine induces connective tissue growth factor expression in vascular smooth muscle cells. *J Thromb Haemost.* 2008;6(1):184-92.
- Liu X, Gai Y, Liu F, et al. Trimetazidine inhibits pressure overload-induced cardiac fibrosis through NADPH oxidase-ROS-CTGF pathway. *Cardiovasc Res.* 2010;88(1):150-8.
- López-Franco O, Hernández-Vargas P, Ortiz-Muñoz G, et al. Parthenolide modulates the NF-kappaB mediated inflammatory responses in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(8):1864-70.
- Luan Y, Chao S, Ju ZY, et al. Therapeutic effects of baicalin on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by inhibiting inflammatory response. *Int Immunopharmacol.* 2015. pii: S1567-5769(15)00016-8.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407(6801):233-241.
- Makki N, Thiel KW, Miller FJ Jr. The epidermal growth factor receptor and its ligands in cardiovascular disease. *Int J Mol Sci.* 2013;14(10):20597-613.
- Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens.* 2013;(7):1281-357.
- Martin AG, Fresno M. Tumor necrosis factor-alpha activation of NF-kappa B requires the phosphorylation of Ser-471 in the transactivation domain of c-Rel. *J Biol Chem.* 2000;275(32):24383-91.
- Martínez-Revelles S, Avendaño MS, García-Redondo AB, et al. Reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(1):51-65.
- Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Gómez-Hernández A, et al. Intensive treatment with atorvastatin reduces inflammation in mononuclear cells and human atherosclerotic lesions in one month. *Stroke.* 2005;36(8):1796-800.
- Martynowicz H, Janus A, Nowacki D, et al. The Role of Chemokines in Hypertension *Adv Clin Exp Med.* 2014; 23(3), 319–325.
- Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 2005;19(23):2783-810.
- Mathers CD, Loncar D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. Samet J, ed. *PLoS Medicine.* 2006;3(11):e442.
- Matrougui K. Diabetes and Microvascular Physio-Pathology: Role of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase. *Diabetes/metabolism research and reviews.* 2010;26(1):13-16.
- Matsubara H, Moriguchi Y, Mori Y, et al. Transactivation of EGF receptor induced by angiotensin II regulates fibronectin and TGF-beta gene expression via transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Mol Cell Biochem.* 2000;212(1-2):187-201.
- McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(7-8):1034-53.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008;454 (7203): 428-35.
- Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell.* 2010;140(6):771-6.
- Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(1):C82-97
- Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;176 (Pt 1): 213–254.
- Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kB signaling. *Cell Res.* 2011;21:103–115.

- Mori T, Kawara S, Shinozaki M, et al. Role and interaction of connective tissue growth factor with 58. transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol.* 1999;181: 153–159.
- Moriguchi Y, Matsubara H, Mori Y, et al. Angiotensin II–Induced Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor Regulates Fibronectin and Transforming Growth Factor- β Synthesis via Transcriptional and Post-transcriptional Mechanisms. *Circ Res.* 1999;84:1073-1084.
- Moussad EE, Brigstock DR. Connective tissue growth factor: what's in a name?. *Mol Genet Metab.* 2000;71(1-2):276-92.
- Moustakas A, Pardali K, Gaal A et al. Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol Lett.* 2002;82(1-2):85-91.
- Moustakas A, Heldin C-H. Non-Smad TGF- β signals. *J Cell Sci.* 2005;(118): 3573-3584.
- Münzel T, Gori T, Bruno RM, et al. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease?. *Eur Heart J.* 2010;31(22):2741-8.
- Muñoz ME, Galan AI, Palacios E, et al. Effect of an antioxidant functional food beverage on exercise-induced oxidative stress: a long-term and large-scale clinical intervention study. *Toxicology.* 2010;278(1):101-11.
- Murphy M, Godson C, Cannon S, et al. Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth factor and other genes in human mesangial cells. *J Biol Chem.* 1999;274(9):5830-4.
- Nègre-Aminou P, van Vliet AK, van Erck M, et al. Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors; comparison with other human cell types. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1345(3):259-68.
- Nguyen Dinh Cat A, Montezano AC, Burger D, et al. Angiotensin II, NADPH Oxidase, and Redox Signaling in the Vasculature. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2013;19(10):1110-1120.
- Nguyen TQ, Tarnow L, Andersen S, et al. Urinary connective tissue growth factor excretion correlates with clinical markers of renal disease in a large population of type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Care.* 2006;29(1):83-8.
- Nguyen TQ, Tarnow L, Jorsal A, et al. Plasma connective tissue growth factor is an independent predictor of end-stage renal disease and mortality in type 1 diabetic nephropathy. *Diabetes Care.* 2008;31(6):1177-82.
- NICE 2011: National Institute for Health and Care Excellence 2011. Disponible en: <https://www.nice.org.uk/search?q=statins>. [Accesado el día 20 de marzo de 2015].
- Nishida T, Nakanishi T, Shimo T, et al. Demonstration of receptors specific for connective tissue growth factor on a human chondrocytic cell line (HCS-2/8). *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;247(3):905-9.
- Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- κ B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 2009;1(4):a000034.
- Oemar BS, Werner A, Garnier JM, et al. Human connective tissue growth factor is expressed in advanced atherosclerotic lesions. *Circulation.* 1997;9:831–839.
- O'Neill LA. Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(7):549-63.
- Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB, et al. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Vascular Inflammation and Remodeling. *International Journal of Inflammation.* 2014;2014:689360.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological reviews.* 2007;87(1):315-424.

- Panek AN, Posch MG, Alenina N, et al. Connective tissue growth factor over- expression in cardiomyocytes promotes cardiac hypertro- phy and protection against pressure overload. *PLoS One*. 2009; 4: e6743.
- Park SK, Kim J, Seomun Y, et al. Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;284(4):966-71.
- Peeters W, Hellings WE, de Kleijn DP, et al. Carotid atherosclerotic plaques stabilize after stroke: insights into the natural process of atherosclerotic plaque stabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(1):128-33
- Perbal B. The CCN family of genes: a brief history. *Molecular Pathology*. 2001;54(2):103-104.
- Perbal B. CCN proteins: multifunctional signaling regulators. *Lancet*. 2004;(363): 62–64.
- Phanish MK, Winn SK, Dockrell ME. Connective tissue growth factor-(CTGF, CCN2)-a marker mediator and therapeutic target for renal fibrosis. *Nephron Exp Nephrol*. 2010;114: e83–e92.
- Piccirillo CA, Chang Y, Prud'homme GJ. TGF-beta1 somatic gene therapy prevents autoimmune disease in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 1998;161(8):3950-6.
- Piqueras L, Kubes P, Alvarez A. Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT(1) and AT(2) receptor-mediated P-selectin upregulation. *Circulation*. 2000;102(17):2118-23.
- Ponticos M. Connective tissue growth factor (CCN2) in blood vessels. *Vascul Pharmacol*. 2013;58: 189–193.
- Ponticos M, Holmes AM, Shi-wen X, et al. Pivotal role of connective tissue growth factor in lung fibrosis: MAPK-dependent transcriptional activation of type I collagen. *Arthritis Rheum*. 2009;60: 2142–2155.
- Puchtler, H, Waldrop, FS, Valentine LS. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beitr. Pathol*. 1973;150:174–187
- Rachfal AW, Brigstock DR. Structural and functional properties of CCN proteins. *Vitam Horm*. 2005;(70):69-103.
- Rada B, Leto TL. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH Oxidases. *Contributions to microbiology*. 2008;(15):164-187.
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987;148(3):1482-9.
- Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M et al. Atherosclerosis: Process, Indicators, Risk Factors and New Hopes. *International Journal of Preventive Medicine*. 2014;5(8):927-946.
- Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation.vContribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*. 1996;97(8):1916-23.
- Rayego-Mateos S, Rodrigues-Díez R, Morgado-Pascual JL, et al. Connective tissue growth factor is a new ligand of epidermal growth factor receptor. *J Mol Cell Biol*. 2013;5(5):323-35.
- Redgrave J.N.E.; Lovett J.K., Gallagher P.J., et al. Histological Assessment of 526 Symptomatic Carotid Plaques in Relation to the Nature and Timing of Ischemic Symptoms: The Oxford Plaque Study. *Circulation*. 2006;113:2320-2328.
- Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, et al. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation*. 1999;100(3):230-5.
- Rimón E, Chen B, Shanks AL, et al. Hypoxia in Human Trophoblasts Stimulates the Expression and Secretion of Connective Tissue Growth Factor. *Endocrinology*. 2008;149(6):2952-2958.

- Riser BL, Cortes P, DeNichilo M, et al. Urinary CCN2 (CTGF) as a possible predictor of diabetic nephropathy: preliminary report. *Kidney Int.* 2003;64(2):451-8.
- Rodrigues-Díez R, Rodrigues-Díez RR, Rayego-Mateos S, et al. The C-terminal module IV of connective tissue growth factor is a novel immune modulator of the Th17 response. *Lab Invest.* 2013;93(7):812-24.
- Rodríguez-Vita J, Ruiz-Ortega M, Rupérez M, et al. Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 2005;97:125–134.
- Rodríguez-Vita J, Sánchez-López E, Esteban V, et al. Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism. *Circulation.* 2005;111(19):2509-17.
- Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, et al. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. *Hypertension.* 2001;38(6):1382-7.
- Ruiz-Ortega M, Ruperez M, Esteban V, et al. Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury. *Curr Hypertens Rep.* 2003;5(1):73-9.
- Ruiz-Ortega M, Esteban V, Rupérez M, et al. Renal and vascular hypertension-induced inflammation: role of angiotensin II. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006;15(2):159-66.
- Ruiz-Ortega M, Rodríguez-Vita J, Sánchez-Lopez E, et al. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res.* 2007;74(2):196-206.
- Rupérez M, Lorenzo O, Blanco-Colio LM, et al. Connective tissue growth factor is a mediator of angiotensin II-induced fibrosis. *Circulation.* 2003;108(12):1499-505.
- Saito T, Hasegawa Y, Ishigaki Y, et al. Importance of endothelial NF-κB signalling in vascular remodelling and aortic aneurysm formation. *Cardiovasc Res.* 2013;97(1):106-14.
- San Martín A, Griendling KK. NADPH oxidases: progress and opportunities. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(17):2692-4.
- Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Cartier C, et al. Inhibitory effect of interleukin-1 on angiotensin II-induced connective tissue growth factor and type IV collagen production in cultured mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;(294): F149–F160.
- Sánchez-López E, Rayego S, Rodrigues-Díez R, et al. CTGF Promotes Inflammatory Cell Infiltration of the Renal Interstitium by Activating NF-κB. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN.* 2009;20(7):1513-1526.
- Sánchez-López E, Rodrigues Díez R, Rodríguez Vita J, et al. Connective tissue growth factor (CTGF): a key factor in the onset and progression of kidney damage. *Nefrologia.* 2009;29(5):382-91.
- Sanfélix-Gimeno G, Peiró S, Librero J, et al. Population analysis by area of health of changes in consumption, price and expenditure of cardiovascular drugs in eight autonomous communities, Spain, 2005. *Rev Esp Salud Pública.* 2010;84(4):389-407.
- Sanz AB, Sánchez-Niño MD, Ramos AM, et al. NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol.* 2010 (21):1254–1262,.
- Savoia C, Schiffrin EL. Vascular inflammation in hypertension and diabetes: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Clin Sci (Lond).* 2007;(112): 375–384.
- Schalkwijk CG, Smulders RA, Lambert J, et al. ACE-inhibition modulates some endothelial functions in healthy subjects and in normotensive type 1 diabetic patients. *Eur J Clin Invest.* 2000; 30(10):853-60.
- Schreier B, Gekle M, Grossmann C. Role of epidermal growth factor receptor in vascular structure and function. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014;23:113–121.
- Seaghdha CMO, Hwang S-J, Bhavsar NA, et al. Lower Urinary Connective Tissue Growth Factor Levels and Incident CKD Stage 3 in the General Population. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation.* 2011;57(6):841-849.

- Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, et al. Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res*. 2002;91(5):406-13.
- Singh NN, Ramji DP. The role of transforming growth factor-beta in atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006;17(6):487-99.
- Sirker A, Zhang M, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies. *Basic Res Cardiol*. 2011;106: 735–747.
- Slagman MCJ, Nguyen TQ, Waanders F, et al. Effects of Antiproteinuric Intervention on Elevated Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN-2) Plasma and Urine Levels in Nondiabetic Nephropathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*. 2011;6(8):1845-1850.
- Song ZP, Liu X, Zhang DD. Connective tissue growth factor: a predictor of recurrence after catheter ablation in patients with nonparoxysmal atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol*. 2014;37(5):630-7.
- Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129(25 Suppl 2):S1-45.
- Sun Y, Oberley LW. Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic Biol Med*. 1996;21(3):335-48.
- Szabó Z, Magga J, Alakoski T et al. Connective tissue growth factor inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in pressure overload-induced heart failure. *Hypertension*. 2014;63(6):1235-40.
- Tak PP, Firestein GS. NF-κB: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;107(1):7-11.
- Tam FW, Riser BL, Meeran K, et al. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and connective tissue growth factor (CCN2) as prognostic markers for progression of diabetic nephropathy. *Cytokine*. 2009;47(1):37-42.
- Tousoulis D, Kampoli AM, Stefanadis C. Diabetes mellitus and vascular endothelial dysfunction: current perspectives. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012;10:19–32.
- Touyz RM. Molecular and cellular mechanisms regulating vascular function and structure--implications in the pathogenesis of hypertension. *Can J Cardiol*. 2000;16(9):1137-46.
- Touyz RM. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2000;2(1):98-105.
- Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*. 2000;52(4):639-72.
- Tozer EC, Carew TE. Residence time of low-density lipoprotein in the normal and atherosclerotic rabbit aorta. *Circ Res*. 1997;80(2):208-18.
- Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonist decreases plasma levels of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and soluble adhesion molecules in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(3): 714-21.
- Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 2003 ;189(1-2):41-54.
- Valko M, Leibfriz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44-84.
- Van Buul JD, Fernandez-Borja M, Anthony EC, et al. Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7: 308–317.
- Van der Heiden K, Cuhlmann S, Luong le A, et al. Role of nuclear factor kappaB in cardiovascular health and disease. *Clin Sci (Lond)*. 2010;118(10):593-605.

- Van Geest RJ, Leeuwis JW, Dendooven A, et al. Connective Tissue Growth Factor Is Involved in Structural Retinal Vascular Changes in Long-Term Experimental Diabetes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 2014;62(2):109-118.
- Varga J, Jimenez SA. Stimulation of normal human fibroblast collagen production and processing by transforming growth factor-beta. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986;138(2):974-80.
- Virdis A, Duranti E, Taddei S. Oxidative Stress and Vascular Damage in Hypertension: Role of Angiotensin II. *Int J Hypertens*. 2011;2011:916310
- Wahab NA, Weston BS, Mason RM. Modulation of the TGFbeta/Smad signaling pathway in mesangial cells by CTGF/CCN2. *Exp Cell Res*. 2005;307(2):305-14.
- Wang R, Xu YJ, Liu XS, et al. Knockdown of connective tissue growth factor by plasmid-based short hairpin RNA prevented pulmonary vascular remodeling in cigarette smoke-exposed rats. *Arch Biochem Biophys*. 2011;(508): 93–100.
- Wang W, Koka V, Lan HY. Transforming growth factor-beta and Smad signalling in kidney diseases. *Nephrology (Carlton)*. 2005;10(1):48-56.
- Wang W, Liu F, Chen N. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ (PPAR-γ) Agonists Attenuate the Profibrotic Response Induced by TGF-β1 in Renal Interstitial Fibroblasts. *Mediators of Inflammation*. 2007;2007:62641.
- Wang X, McLennan SV, Allen TJ, et al. Regulation of proinflammatory and profibrotic factors by CCN2/CTGF in H9c2 cardiomyocytes. *J Cell Commun Signal*. 2010;4:15–23.
- Weber C, Erl W, Weber KS et al. HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD11b expression and CD11b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30(5):1212-7.
- Weil R, Israël A. T-cell-receptor- and B-cell-receptor-mediated activation of NF-kappaB in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(3):374-81.
- Wu SH, Lu C, Dong L, et al. Signal transduction involved in CTGF-induced production of chemokines in mesangial cells. *Growth Factors*. 2008 26(4):192-200.
- Wynn T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of pathology*. 2008;214(2):199-210.
- Xiao G, Rabson AB, Young W, et al. Alternative pathways of NF-kappaB activation: a double-edged sword in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006 ;17(4):281-93.
- Yardeni T, Eckhaus M, Morris HD, et al. Retro-orbital injections in mice. *Lab animal*. 2011;40(5):155-160.
- Yokoi H, Mukoyama M, Sugawara A, et al. Role of connective tissue growth factor in fibronectin expression and tubulointerstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;282(5):F933-42.
- Zhao B, Chen Y-G. Regulation of TGF-β Signal Transduction. *Scientifica*. 2014;2014:874065.
- Zhao H, Joseph J, Fales HM, et al. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(16):5727-5732.
- Zhou G, Li C, Cai L. Advanced Glycation End-Products Induce Connective Tissue Growth Factor-Mediated Renal Fibrosis Predominantly through Transforming Growth Factor β-Independent Pathway. *The American Journal of Pathology*. 2004;165(6):2033-2043.
- Zielonka J, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine. *Nat Protoc*. 2008;3(1):8-2.

Anexo

ANEXO

Los resultados presentados en esta tesis han sido publicados en:

- **Rodriguez-Diez RR**, Garcia-Redondo AB, Orejudo M, Rodriguez-Diez R, Briones AM, Bosch-Panadero E, Kery G, Pato J, Ortiz A, Salaices M, Egido J, Ruiz-Ortega M. The C-terminal module IV of connective tissue growth factor, through EGFR/Nox1 signaling, activates the NF- κ B pathway and proinflammatory factors in vascular smooth muscle cells. *Antioxid Redox Signal*. 2015;22(1):29-47. (Se adjunta copia del artículo completo al final del anexo).

Otros trabajos publicados durante el desarrollo de la tesis:

- Rodriguez-Diez R, **Rodriguez-Diez RR**, Lavozy C, Carvajal G, Droguett A, Garcia-Redondo AB, Rodriguez I, Ortiz A, Egido J, Mezzano S, Ruiz-Ortega M. Gremlin Activates the Smad Pathway Linked to Epithelial Mesenchymal Transdifferentiation in Cultured Tubular Epithelial Cells. *BioMed Research International*. 2014;2014:802841.
- Rodriguez-Diez R, Aroeira LS, Orejudo M, Bajo MA, Heffernan JJ, **Rodriguez-Diez RR**, Rayego-Mateos S, Ortiz A, Gonzalez-Mateo G, López-Cabrera M, Selgas R, Egido J, Ruiz-Ortega M. IL-17A is a novel player in dialysis-induced peritoneal damage. *Kidney Int*. 2014;86(2):303-15.
- Rayego-Mateos S, Rodriguez-Diez R, Morgado-Pascual JL, **Rodriguez-Diez RR**, Mas S, Lavozy C, Alique M, Pato J, Keri G, Ortiz A, Egido J, Ruiz-Ortega M. Connective tissue growth factor is a new ligand of epidermal growth factor receptor. *J Mol Cell Biol*. 2013;5(5):323-35.
- Rodriguez-Diez R, **Rodriguez-Diez RR**, Rayego-Mateos S, Suarez-Alvarez B, Lavozy C, Stark Aroeira L, Sánchez-López E, Orejudo M, Alique M, Lopez-Larrea C, Ortiz A, Egido J, Ruiz-Ortega M. The C-terminal module IV of connective tissue growth factor is a novel immune modulator of the Th17 response. *Lab Invest*. 2013;93(7):812-24.
- Lavozy C, Rodriguez-Diez R, Benito-Martin A, Rayego-Mateos S, **Rodriguez-Diez RR**, Alique M, Ortiz A, Mezzano S, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II contributes to renal fibrosis independently of Notch pathway activation. *PLoS One*. 2012;7(7):e40490.
- Rodriguez-Diez R, Lavozy C, Carvajal G, Rayego-Mateos S, **Rodriguez-Diez RR**, Ortiz A, Egido J, Mezzano S, Ruiz-Ortega M. Gremlin is a downstream profibrotic mediator of transforming growth factor-beta in cultured renal cells. *Nephron Exp Nephrol*. 2012;122(1-2):62-74.
- **Rodriguez-Diez R**, Rodriguez-Diez R, Lavozy C, Rayego-Mateos S, Civantos E, Rodríguez-Vita J, Mezzano S, Ortiz A, Egido J, Ruiz-Ortega M. Statins inhibit angiotensin II/Smad pathway and related vascular fibrosis, by a TGF-beta-independent process. *PLoS One*. 2010;5(11):e14145.
- Briones AM1, Rodríguez-Criado N, Hernanz R, García-Redondo AB, **Rodriguez-Diez RR**, Alonso MJ, Egido J, Ruiz-Ortega M, Salaices M. Atorvastatin prevents angiotensin II-induced vascular remodeling and oxidative stress. *Hypertension*. 2009;54(1):142-9.

- Sánchez-López E, Rayego S, Rodrigues-Díez R, Rodríguez JS, **Rodrigues-Díez R**, Rodríguez-Vita J, Carvajal G, Aroeira LS, Selgas R, Mezzano SA, Ortiz A, Egido J, Ruiz-Ortega M.. CTGF promotes inflammatory cell infiltration of the renal interstitium by activating NF-kappaB. J Am Soc Nephrol. 2009 Jul;20(7):1513-26.
- Sánchez-López E, Rodrigues Díez R, Rodríguez Vita J, Rayego Mateos S, **Rodrigues Díez RR**, Rodríguez García E, Lavoiz Barria C, Mezzano S, Egido J, Ortiz A, Ruiz-Ortega M, Selgas R. Connective tissue growth factor (CTGF): a key factor in the onset and progression of kidney damage. Nefrologia. 2009;29(5):382-91.
- Rodrigues-Díez R, Carvajal-González G, Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, **Rodrigues Díez R**, Selgas R, Ortiz A, Egido J, Mezzano S, Ruiz-Ortega M.. Pharmacological modulation of epithelial mesenchymal transition caused by angiotensin II. Role of ROCK and MAPK pathways. Pharm Res. 2008 Oct;25(10):2447-61.